



ΥΠΟΥΡΓΕΙΟ ΕΘΝΙΚΗΣ ΠΑΙΔΕΙΑΣ ΚΑΙ ΘΡΗΣΚΕΥΜΑΤΩΝ
ΕΙΔΙΚΗ ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ ΕΠΕΑΕΚ
ΕΥΡΩΠΑΪΚΗ ΕΝΩΣΗ
ΣΥΓΧΡΗΜΑΤΟΔΟΤΗΣΗ
ΕΥΡΩΠΑΪΚΟ ΚΟΙΝΩΝΙΚΟ ΤΑΜΕΙΟ
ΕΥΡΩΠΑΪΚΟ ΤΑΜΕΙΟ ΠΕΡΙΦΕΡΕΙΑΚΗΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ



Η ΠΑΙΔΕΙΑ ΣΤΗΝ ΚΟΡΥΦΗ
Επιχειρησιακό Πρόγραμμα
Εκπαίδευσης και Αρχικής
Επαγγελματικής Κατάρτισης

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΠΟΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ ΙΧΘΥΟΛΟΓΙΑΣ
ΚΑΙ ΥΔΑΤΙΝΟΥ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**«Ανίχνευση DNA βλάβης/επιδιόρθωσης με COMET ανάλυση
σε εκτρεφόμενους και φυσικούς πληθυσμούς ιχθύων
εκτεθειμένους σε βαρέα μέταλλα»**

ΚΑΒΟΥΡΑΣ ΜΕΝΕΛΑΟΣ

ΒΟΛΟΣ 2009

**«Ανίχνευση DNA βλάβης/επιδιόρθωσης με COMET ανάλυση σε
εκτρεφόμενους και φυσικούς πληθυσμούς ιχθύων εκτεθειμένους σε
βαρέα μέταλλα»**

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή

- **Εξαδάκτυλος Αθανάσιος, Επίκουρος Καθηγητής, Γενετική Υδρόβιων Ζωϊκών Οργανισμών, Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας & Υδάτινου Περιβάλλοντος, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Επιβλέπων.**
- **Παναγιωτάκη Παναγιώτα, Μόνιμη Επίκουρη Καθηγήτρια, Υδατοκαλλιέργειες, Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας & Υδάτινου Περιβάλλοντος, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Μέλος.**
- **Αντωνοπούλου Ευθυμία, Λέκτορας, Φυσιολογία Ζωικών Οργανισμών με έμφαση στους ιχθύς, Τμήμα Βιολογίας, Σχολή Θετικών Επιστημών, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, Μέλος.**

Στην οικογένειά μου

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θεωρώ υποχρέωση μου να ευχαριστήσω όλους όσους βοήθησαν και συνέβαλαν στην πραγματοποίηση αυτής της εργασίας και κυρίως την οικογένεια μου για την ηθική και υλική συμπαράσταση.

Ιδιαίτερα θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Επίκουρο Καθηγητή κ. Αθανάσιο Εξαδάκτυλο, τη Μόνιμη Επίκουρο Καθηγήτρια κ. Παναγιώτα Παναγιωτάκη και τη Λέκτορα κ. Αντωνοπούλου Ευθυμία για την πολύτιμη και αμέριστη βοήθεια τους, το χρόνο που μου αφιέρωσαν και τις εύστοχες παρατηρήσεις τους.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω το φίλο και κουμπάρο Δημήτρη Μαγγιώρη για τη γόνιμη συνεισφορά του υπό μορφή συμβουλών, παραινέσεων και τις αμέτρητες ώρες συζητήσεων, το φίλο και συνάδελφο Μανόλη Μαλανδράκη για την πολύτιμη βοήθεια του στο στήσιμο του πειράματος και επίσης, τις αμέτρητες ώρες συζητήσεων, τη φίλη Ελένη Γκολομάζου για τις πολύτιμες υπηρεσίες της κατά τη δειγματοληψία και τις εύστοχες παρατηρήσεις της για το σχεδιασμό και την εκτέλεση του πειράματος και τον αδερφό μου Μιχάλη για τη συμπαράσταση και κατανόηση που έδειξε όλο αυτό το διάστημα.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα μέταλλα δε βιοαποικοδομούνται και συσσωρεύονται στους ιστούς των οργανισμών μέσω της τροφικής αλυσίδας. Από περιβαλλοντικής άποψης, η βιοσυσσώρευση είναι σημαντική επειδή τα βαρέα μέταλλα απαντώνται σε χαμηλές συγκεντρώσεις στο υδάτινο περιβάλλον και η επίδρασή τους παραμένει απαραίτητη μέχρι να γίνουν εμφανείς μεγάλης κλίμακας, χρόνιες αντιδράσεις, όπως αλλαγή στη δομή του πληθυσμού, στην αναπαραγωγή, βλάβη στο DNA, κ.α. Επιπλέον, τα μέταλλα σε χαμηλές συγκεντρώσεις (ιχνοστοιχεία), είναι απαραίτητα για τη εύρυθμη λειτουργία της φυσιολογίας των οργανισμών.

Η τσιπούρα (*Sparus aurata*) αποτελεί πολύ σημαντικό εμπορικό είδος στην Ευρώπη, η εντατική εκτροφή της οποίας τα τελευταία χρόνια έχει αυξηθεί κατά πολύ. Επιπλέον η επιβάρυνση των παράκτιων περιοχών και των θαλασσών με βαρέα μέταλλα, λόγω της αυξανόμενης βιομηχανικής και αστικής δραστηριότητας καθώς και της εντατικής αγροτικής καλλιέργειας με τη χρήση γεωργικών φαρμάκων και λιπασμάτων, έχει άμεση επίπτωση στο υδάτινο οικοσύστημα.

Επειδή τα αποτελέσματα της βιοσυσσώρευσης των μετάλλων, δεν είναι άμεσα ανιχνεύσιμα παρά μόνο όταν είναι πλέον αργά, σκοπός της εργασίας ήταν η βελτίωση της γνώσης μας στην οξεία τοξικότητα των μετάλλων και η επίδραση που έχει στη δημιουργία βλαβών στο DNA των οργανισμών. Συγκεκριμένα, του χαλκού (Cu) και του ψευδαργύρου (Zn), σε εύρος συγκεντρώσεων παρόμοιων με αυτών που παρατηρούνται σε επιβαρυμένα θαλάσσια οικοσυστήματα: 0,1-0,5 ppm και 0,2-1,0 ppm αντίστοιχα.

Στην παρούσα εργασία, άτομα τσιπούρας μήκους 12-16cm και βάρους 60-90g, τοποθετήθηκαν σε δεξαμενές με θαλασσινό νερό 500L σε κλειστό κύκλωμα στο εργαστήριο και εγκλιματίστηκαν για τρεις εβδομάδες. Ο πειραματικός σχεδιασμός περιλάμβανε τέσσερις μεταχειρίσεις, με δύο επαναλήψεις, επιπλέον του μάρτυρα. Οι συνθήκες κατά τη διάρκεια του πειράματος ήταν οι ακόλουθες: ιχθυοφόρτιση 4kg/m^3 , θερμοκρασία $17-20^\circ\text{C}$, pH 7,4, συγκέντρωση αμμωνίας 0,5-2ppm, αλατότητα 34, διαλυμένο οξυγόνο 5-7mg/L. Η διάρκεια έκθεσης των ιχθύων στα παραπάνω μέταλλα ήταν 24 και 96 ώρες για δύο διαφορετικές συγκεντρώσεις (0,1 και 0,5 ppm για το χαλκό και 0,2 και 1,0 ppm για το ψευδάργυρο). Η τεχνική που χρησιμοποιήθηκε για την εκτίμηση της γενotoξικότητας των προαναφερθέντων βαρέων μετάλλων στα ηπατοκύτταρα και την εκτίμηση του βαθμού επιδιόρθωσης του DNA ήταν η «comet assay» ή «ανάλυση κομητών».

Μέρος των ηπατοκυττάρων που απομονώθηκαν εξετάστηκαν απευθείας για την εκτίμηση της γενotoξικότητας των βαρέων μετάλλων (*in vivo* εκτίμηση) ενώ τα υπόλοιπα, επωάστηκαν σε υγρή καλλιέργεια, χωρίς την προσθήκη χαλκού ή ψευδαργύρου, σε θρεπτικό υλικό (Leibovitz L-15, 10% βόειο ορό-FCS- και 1% αντιβιοτικά πενικιλίνη/στρεπτομυκίνη) σε θερμοκρασία δωματίου 22°C για 2 ώρες, για την αναγνώριση βλάβης του DNA, που δεν εντοπίστηκε κατά το στάδιο της *in vivo* εφαρμογής, από τα ένζυμα επιδιόρθωσης (*ex vivo* εκτίμηση).

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η «ανάλυση κομητών είναι μια πρακτική τεχνική που μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την εκτίμηση των γενotoξικών κινδύνων από βαρέα μέταλλα όπως ο χαλκός και ο ψευδάργυρος στους υδρόβιους οργανισμούς. Η ερμηνεία των αποτελεσμάτων όμως, χρειάζεται

ιδιαίτερη προσοχή. Ο χαλκός και ο ψευδάργυρος φαίνεται να επιδρούν γενοτοξικά στα ηπατοκύτταρα της τσιπούρας αλλά με διαφορετικό τρόπο δράσης. Η γενοτοξικότητα του χαλκού φαίνεται να είναι δοσοεξαρτώμενη αλλά όχι χρονοεξαρτώμενη, που συνηγορεί στην ενεργοποίηση μηχανισμών αποβολής του μετάλλου από τα ηπατοκύτταρα με την πάροδο του χρόνου.

Η εικόνα της γενοτοξικότητας του ψευδαργύρου *in vivo*, δείχνει να είναι χρονοεξαρτώμενη για έκθεση σε χαμηλή συγκέντρωση και δοσοεξαρτώμενη στις 96 ώρες. Αντίστοιχα *ex vivo*, η γενοτοξικότητα είναι χρονοεξαρτώμενη τόσο σε χαμηλές όσο και σε υψηλές συγκεντρώσεις, ενώ εμφανίζει αρνητική δοσοεξαρτώμενη συσχέτιση και για τα δύο χρονικά διαστήματα (24 και 96 ώρες). Αυτό ίσως εξηγείται επειδή ο ψευδάργυρος επιδρά διαφορετικά τόσο στο DNA όσο και στους μηχανισμούς επιδιόρθωσης σε σχέση με το χαλκό. Η έκθεση σε χαμηλή συγκέντρωση φαίνεται να ενεργοποιεί την επιδιόρθωση, ενώ σε υψηλή συγκέντρωση να την αναστέλλει.

Χαλκός και ψευδάργυρος έχουν γενοτοξική δράση στις συγκεντρώσεις που εξετάστηκαν στην παρούσα εργασία, αλλά διαφέρουν μεταξύ τους ως προς τον τρόπο πρόκλησης της βλάβης και εξουδετέρωσης τους από τα κύτταρα.

Λέξεις κλειδιά: ανάλυση κομητών, χαλκός, ψευδάργυρος, γενοτοξικότητα.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1. Εισαγωγή	10
2. Υλικά και Μέθοδοι	19
2.1 <i>Sparus aurata</i> (Τσιπούρα)	19
2.2 Ιχθύες και συνθήκες εκτροφής	23
2.3 Δειγματοληψία	28
2.3.1 Απομόνωση ηπατοκυττάρων	29
2.4 Ανάλυση κομητών (comet assay)	30
2.4.1 Αλκαλική μικρο-γέλη ηλεκτροφόρηση	33
2.4.2 Επίστρωση αγαρόζης σε αντικειμενοφόρο πλάκα	35
2.4.3 Λύση, ηλεκτροφόρηση και μέτρηση κομητών	36
2.5 Επιδιόρθωση	39
2.6 Στατιστική ανάλυση	46
3. Αποτελέσματα	48
3.1 Απομόνωση ηπατοκυττάρων	48
3.2 Εκτίμηση της βλάβης του DNA – Υπολογισμός της παραμέτρου TM	50
3.3 Ανάλυση αποτελεσμάτων	52
4. Συζήτηση	65
4.1 Βαρέα μέταλλα	65
4.1.1 Ψευδάργυρος	67
4.1.1.1 Επίδραση του ψευδαργύρου στους ιχθύς	69
4.1.2 Χαλκός	71

4.1.2.1	Αύξηση του επιπέδου χαλκού και παράγοντες που επηρεάζουν την τοξικότητά του.	72
4.1.2.2	Επίδραση του χαλκού στους ιχθύς.....	73
4.2	Εφαρμογές της τεχνικής «ανάλυσης κομητών».....	76
4.3	Συζήτηση αποτελεσμάτων της παρούσας εργασίας.....	79
5.	Βιβλιογραφία.....	87
6.	Abstract.....	99

1. Εισαγωγή

Η ρύπανση των υδάτων είναι μία από της κυριότερες αιτίες που έχει ευαισθητοποιήσει τόσο την επιστημονική κοινότητα όσο και τους πολίτες πάνω σε περιβαλλοντικά ζητήματα και η οποία όχι μόνο επηρεάζει την υγεία και την ευημερία ανθρώπων και ζωντανών οργανισμών, αλλά έχει καταστρεπτικές επιπτώσεις στη βιοποικιλότητα και στην παγκόσμια οικονομία (Sehgal and Saxena, 1986).

Σύμφωνα με τον Mason (1991), υπάρχουν πέντε κύριοι τύποι τοξικών ρυπαντών:

- i) Μέταλλα που προέρχονται από τη βιομηχανία και από γεωργικές εφαρμογές (μόλυβδος, χαλκός, νικέλιο και ψευδάργυρος)
- ii) Οργανικές ενώσεις με βιομηχανική, αγροτική, και οικιακή προέλευση (ζιζανιοκτόνα, PCB' s, φυτοφάρμακα, οργανομεταλλικές ενώσεις και φαινόλες)
- iii) Αέρια (αμμωνία και χλώριο)
- iv) Ανιόντα (κυανιούχα, φθοριούχα, θειούχα και θειικά)
- v) Οξέα και βάσεις

Μεταξύ όλων των προαναφερθέντων ρυπαντών, τα μέταλλα παίζουν σημαντικό ρόλο στην ποιότητα των υδάτων (Witeska *et al.*, 1995). Είναι στοιχεία που βρίσκονται φυσιολογικά στα υδάτινα οικοσυστήματα εξαιτίας ορισμένων φυσικών διεργασιών και φαινομένων όπως ο καιρός και η διάβρωση του εδάφους (Viljoen, 1999). Ορισμένα από αυτά είναι απαραίτητα στους έμβιους οργανισμούς σε χαμηλές συγκεντρώσεις (ιχνοστοιχεία), όπως π.χ. ο χαλκός και ο ψευδάργυρος. Το άριστο επίπεδο συγκέντρωσης αυτών των στοιχείων για την εύρυθμη λειτουργία φυσιολογικών λειτουργιών όπως η

ανάπτυξη και η αναπαραγωγή, έχει στενό εύρος διακύμανσης. Περίσσεια ή έλλειψη μπορεί να είναι επιζήμια (Pelgrom *et al.*, 1994), με την υψηλή συγκέντρωση να θεωρείται τοξική για τους υδρόβιους οργανισμούς (Wepener *et al.* 2001). Άλλα μέταλλα όπως για παράδειγμα το κάδμιο και ο μόλυβδος, δεν είναι απαραίτητα, διότι δεν συμμετέχουν σε βιολογικές λειτουργίες (Seymore, 1994). Είναι βέβαιο γι' αυτά, ότι είναι από τους μεγαλύτερους ρυπαντές των υδάτινων οικοσυστημάτων και είναι τοξικά ακόμα και σε μικρές συγκεντρώσεις στα φυσικά ύδατα (Pelgrom *et al.*, 1994).

Τα μέταλλα απαντώνται στα φυσικά υδάτινα οικοσυστήματα σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις, της τάξης των ng ή μg/L. Η αύξηση της παρουσίας των βαρέων μετάλλων στο περιβάλλον οφείλεται κατά κύριο λόγο στην ανθρώπινη παρέμβαση.

Η πρόσληψη των μετάλλων από τους υδρόβιους οργανισμούς αποτελείται από δύο στάδια: το πρώτο περιλαμβάνει την άμεση απορρόφηση ή τη δέσμευσή τους στην εξωτερική επιφάνεια των κυττάρων, και ακολουθεί η βραδύτερη μεταφορά προς το εσωτερικό τους η οποία επιτελείται είτε με διάχυση, μέσω κυτταρικής μεμβράνης, είτε με ενεργητική μεταφορά με τη βοήθεια πρωτεϊνών (Brezonic *et al.*, 1991: Wepener *et al.*, 2001).

Τα μέταλλα εισάγονται στο περιβάλλον από ένα ευρύ φάσμα φυσικών και ανθρωπογενών παρεμβάσεων (Wepener *et al.*, 2001). Τα βαρέα μέταλλα απαντώνται σε υψηλές συγκεντρώσεις στα υδάτινα οικοσυστήματα εξαιτίας: 1) της απότομης αύξησης του πληθυσμού, 2) της εκβιομηχάνισης, 3) της αστικοποίησης, των κοινωνικό-οικονομικών δραστηριοτήτων και της εξερεύνησης- εκμετάλλευσης των φυσικών πόρων, 4) της ανεξέλεγκτης επέκτασης των αρδεύσεων και διαφόρων νέων αγροτικών πρακτικών, και

τέλος, 5) λόγω της έλλειψης περιβαλλοντικών κανονισμών ή/και τις αδυναμίες που ενδεχομένως αυτοί να έχουν (Biney *et al.*, 1994). Κατά συνέπεια, οι υδρόβιοι οργανισμοί εκτίθενται σε πρωτόγνωρα υψηλές συγκεντρώσεις μετάλλων, θέτοντας τους σε μεγάλο κίνδυνο και απειλώντας κατ' επέκταση το περιβάλλον.

Η ολοένα αυξανόμενη εισαγωγή βαρέων μετάλλων στο υδάτινο οικοσύστημα θέτει σοβαρά προβλήματα ρύπανσης γενικότερα των υδάτινων πόρων εξαιτίας της τοξικότητάς τους, της μακράς παραμονής τους στο περιβάλλον και της βιοσυσσώρευσής τους (Rishi and Jain, 1998). Επιπρόσθετα, είναι σημαντική η μελέτη της βιοσυσσώρευσής τους, για να εκτιμηθεί η επίδρασή τους στην ανθρώπινη υγεία (π.χ. από την κατανάλωση ιχθύων) και στην υγεία των οργανισμών (έκθεσή τους σε μέταλλα).

Παρά την πρόοδο στη διαχείριση των αστικών και βιομηχανικών αποβλήτων, τα βαρέα μέταλλα αποτελούν ακόμα υπαρκτό κίνδυνο για όλα τα έμβια όντα. Σε αντίθεση με άλλες κατηγορίες ρυπαντών, δεν είναι βιοαποικοδομήσιμα και δεν δημιουργούνται ή καταστρέφονται (Werpeper *et al.*, 2001). Επιπλέον είναι δυνατό να μετατραπούν σε περισσότερο τοξικές μορφές ή να σχηματίσουν σύμπλοκα που είναι πιο σταθερά και λιγότερο τοξικά (Viljoen, 1999). Στο υδάτινο περιβάλλον η τοξικότητα των μετάλλων επηρεάζεται από αβιοτικούς παράγοντες όπως τη συγκέντρωση οξυγόνου, τη σκληρότητα του νερού (συγκέντρωση ιόντων Ca^{++}) (Cairns and Mount 1990: Ghillebaert *et al.*, 1995), το pH και τη θερμοκρασία (Cairns and Mount 1990).

Οι αβιοτικοί παράγοντες ως μεταβλητές επιδρούν άμεσα στα άτομα ή στον πληθυσμό. Ιδιαίτερα η θερμοκρασία, είναι ένας σημαντικός παράγοντας που επηρεάζει την τοξικότητα των μετάλλων, επειδή οι περισσότεροι υδρόβιοι

οργανισμοί είναι ποικιλόθερμοι (Strydom *et al.*, 2006). Μελέτες έδειξαν ότι όσο αυξάνει η θερμοκρασία του νερού, οι τοξικές ουσίες γίνονται πιο δραστικές σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις, αυξάνοντας τη θνησιμότητα των ιχθύων (Van Der Merwe *et al.*, 1993). Άλλοι παράγοντες που παίζουν σημαντικό ρόλο, είναι η οργανική ύλη, το διοξείδιο του άνθρακα, η μεταβολική δραστηριότητα, ο βιολογικός χρόνος ημίσειας ζωής του μετάλλου, τα αιωρούμενα σωματίδια, ο ολικός οργανικός άνθρακας (TOC), οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των ρυπαντών, και το στάδιο ωρίμανσης του οργανισμού (Cairns and Mount 1990: Ghillebaert *et al.*, 1995: Kargin and Cogun, 1999). Αυτοί οι παράγοντες καθορίζουν τη «χημική ειδίκευση των μετάλλων» και προφανώς τη βιοδιαθεσιμότητά τους στους υδρόβιους οργανισμούς, καθώς και τις μεταβολές στη τοξικότητά τους (Gomez *et al.*, 1998). Εξαιτίας των παραγόντων που επηρεάζουν τη διαθεσιμότητα και την τοξικότητα των μετάλλων, είναι σημαντικός ο καθορισμός και καταγραφή των φυσικών και χημικών χαρακτηριστικών των υδάτων.

Η κατανομή των μετάλλων στους οργανισμούς, παίζει σπουδαίο ρόλο στη μεταφορά τους μεταξύ των τροφικών επιπέδων, επηρεάζοντας την πρόσληψή τους από τους καταναλωτές (Munger *et al.* 1999). Αν και οι τρόποι αποβολής είναι περισσότεροι από τους τρόπους πρόσληψης, η συσσώρευση των μετάλλων γίνεται σε σύντομο χρονικό διάστημα, ίσως εξαιτίας της παρουσίας πρωτεϊνών στους ιστούς που τα δεσμεύουν ευκολότερα (Kargin and Cogun, 1999).

Τα υδάτινα οικοσυστήματα που είναι επιβαρυμένα με βαρέα μέταλλα χρήζουν συνεχούς καταγραφής και λήψης κατάλληλων μέτρων για το περιορισμό και τον έλεγχο της ρύπανσης. Οι χημικές μέθοδοι που

χρησιμοποιούνται για τις μετρήσεις των βαρέων μετάλλων στο νερό, αν και είναι αρκετά ευαίσθητες, δεν μας δίνουν ακριβείς πληροφορίες για τη βιοδιαθεσιμότητά τους (Rayms-Keller, 1998).

Η ανεξέλεγκτη απόρριψη των αποβλήτων δημιουργεί ρύπανση στο περιβάλλον και επηρεάζει την επιβίωση και τις φυσιολογικές λειτουργίες των οργανισμών. Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, στα φυσικά ύδατα τα μέταλλα απαντώνται ως ελεύθερα ιόντα διαλυμένα στο νερό, ως οργανικά ή ανόργανα σύμπλοκα, ή προσκολλώνται στις επιφάνειες των αιρουμένων σωματιδίων (Brezonic *et al.*, 1991). Τα περισσότερα από αυτά προσλαμβάνονται από τους οργανισμούς με την ιοντική τους μορφή (Kotze *et al.*, 1999). Τα ελεύθερα ιόντα προκαλούν σοβαρότερες επιπτώσεις στους υδρόβιους οργανισμούς από τα σύμπλοκα τους (James *et al.*, 1998). Η διάρκεια έκθεσης σε συγκεκριμένη συγκέντρωση μιας τοξικής ουσίας είναι κρίσιμη για την επιβίωση των υδρόβιων οργανισμών.

Η υγεία των ιχθύων επηρεάζεται από την έκθεση σε βαρέα μέταλλα, είτε με την απευθείας πρόσληψη τους από την υδάτινη στήλη, είτε έμμεσα μέσω της τροφικής αλυσίδας (φυτά, ασπόνδυλα, ιχθύδια). Τα μέταλλα είναι υπεύθυνα για πολλές φυσιολογικές δυσλειτουργίες των ψαριών και επιπλέον παρεμβάλλονται στο μηχανισμό ρύθμισης της πρόσληψης ή της αποβολής ιόντων των κυττάρων (Hansen *et al.*, 1996). Η μη βιοαποικοδόμηση και η βιοσυσσώρευσή τους στους ιστούς, επιδρούν αρνητικά στην υγεία και βιωσιμότητα των ιχθύων και κατ' επέκταση στους καταναλωτές.

Είναι επίσης γνωστό ότι δεν υπάρχει άλλο μόριο, εκτός από το DNA, του οποίου η ακεραιότητα να είναι τόσο ζωτική για τη ζωή του κυττάρου. Κατά τη διάρκεια όμως της ζωής κάθε οργανισμού, τα κύτταρα του εκτίθενται σε

πληθώρα μέσων που έχουν τη δυνατότητα να προκαλέσουν βλάβες στο DNA τους και να προκαλούν μεταλλάξεις. Οι τροποποιήσεις αυτές του DNA πολλές φορές έχουν ως τελικό αποτέλεσμα τη δημιουργία μεταλλάξεων ή την καταστροφή του DNA που οδηγεί το κύτταρο στην απόπτωση (προγραμματισμένος θάνατος) ή ακόμη και τον μετασχηματισμό των φυσιολογικών κυττάρων σε καρκινικά.

Οποιαδήποτε παρέκκλιση από τη συνηθισμένη δομή της διπλής έλικας στο DNA χαρακτηρίζεται ως βλάβη και αποτελεί απειλή για το κύτταρο ή/και τους απογόνους του, καθώς μπορεί να οδηγήσει στην εμφάνιση μεταλλάξεων. Μπορούμε να χωρίσουμε τέτοιες αλλαγές σε δύο γενικές κατηγορίες:

- Αλλαγές μιας βάσης επηρεάζουν την αλληλουχία, αλλά όχι και τη γενική δομή του DNA. Επίσης δεν επηρεάζουν τη μεταγραφή και την αντιγραφή, διαδικασίες κατά τις οποίες οι κλώνοι του DNA είναι διαχωρισμένοι. Οι επιβλαβείς επιπτώσεις των αλλαγών αυτού του είδους εκδηλώνονται σε επόμενες κυτταρικές γενεές, μέσω των αλλαγών που επιφέρουν στην αλληλουχία του DNA. Αλλαγές στην αλληλουχία του DNA μπορεί να προκύψουν ως αποτέλεσμα *in situ* τροποποίησης μιας βάσης ή ακόμα από σφάλματα κατά την αντιγραφή του DNA. Για παράδειγμα, η απαμίνωση της κυτοσίνης σε ουρακίλη (είτε αυθόρμητα είτε λόγω επίδρασης μεταλλαξιογόνων παραγόντων) δημιουργεί ένα αταίριαστο ζεύγος U-G. ένα σφάλμα κατά την αντιγραφή μπορεί να εισάγει μια αδενίνη αντί για μια κυτοσίνη, δημιουργώντας ένα ζεύγος A-G. Παρόμοιες συνέπειες μπορεί να προκληθούν από την ομοιοπολική

σύνδεση μιας μικρής χημικής ομάδας σε μια βάση, γεγονός που μεταβάλλει την ικανότητα να σχηματίζει ζεύγη. Τέτοιου είδους μετατροπές μπορεί να προκαλούν από μία πολύ μικρή δομική παραμόρφωση (όπως στην περίπτωση του ζεύγους U-G) έως και μια αρκετή σημαντική βλάβη (όπως στην περίπτωση του ζεύγους A-G). Το κοινό χαρακτηριστικό τους είναι ότι οι αταίριαστες βάσεις παραμένουν μόνο μέχρι την επόμενη αντιγραφή. Επομένως υπάρχει περιορισμένος χρόνος για να επιδιορθωθεί το σφάλμα, πριν αυτό οδηγήσει στην εμφάνιση ενός μεταλλαγμένου μορίου DNA μετά την αντιγραφή.

- Οι δομικές παραμορφώσεις μπορεί να αποτελούν φυσικά εμπόδια της αντιγραφής ή της μεταγραφής. Ο σχηματισμός ομοιοπολικών δεσμών ανάμεσα σε βάσεις ενός κλώνου ή ανάμεσα σε βάσεις των απέναντι κλώνων αναστέλλει την αντιγραφή και τη μεταγραφή. Η υπεριώδης ακτινοβολία επάγει το σχηματισμό ομοιοπολικών δεσμών ανάμεσα σε δύο γειτονικές βάσεις θυμίνης πάνω στον ένα κλώνο. Παρόμοιες επιπτώσεις μπορεί να έχει η προσθήκη μιας ογκώδους χημικής ομάδας σε μια βάση που θα παραμορφώσει τη δομή της διπλής έλικας. Επίσης, μια εγκοπή σε έναν κλώνο ή απομάκρυνση μιας βάσης, δεν επιτρέπει σε αυτή την περιοχή του κλώνου να λειτουργήσει ως μήτρα για τη σύνθεση DNA ή RNA. Το κοινό χαρακτηριστικό όλων αυτών των αλλαγών είναι ότι η βλάβη παραμένει στο DNA, συνεχίζοντας να διαταράσσει τη δομή και/ή να προκαλεί την εμφάνιση μεταλλάξεων μέχρι να αφαιρεθεί.

Χωρίς έναν αποτελεσματικό μηχανισμό επιδιόρθωσης αυτών των βλαβών του DNA, αυτές θα οδηγούσαν με βεβαιότητα στο γενετικό θάνατο των φορέων τους. Ευτυχώς κατά τη διάρκεια της εξέλιξης, δημιουργήθηκαν αρκετοί επιδιορθωτικοί μηχανισμοί οι οποίοι μπορούν να επιδιορθώσουν τις βλάβες αυτές και να αντιστρέψουν τις δυσμενείς επιπτώσεις τόσο των φυσικών όσο και των τεχνητών μεταλλάξεων. Οι μηχανισμοί αυτοί χωρίζονται σε αυτούς που είναι υπεύθυνοι για την άμεση εξουδετέρωση των επιβλαβών παραγόντων, όπως ορισμένα ενζυμικά συστήματα που είναι επιφορτισμένα με την εξουδετέρωση των παραγόντων προτού αυτοί φτάσουν και αντιδράσουν με το γενετικό υλικό και σ' αυτούς που επιλαμβάνονται εφόσον το DNA έχει υποστεί βλάβη (φωτοενεργοποίηση, επιδιόρθωση εκτομής, επιδιόρθωση ανασυνδυασμού και επιδιόρθωση SOS).

Αντικείμενο της παρούσας εργασίας είναι να μελετηθεί η γενοτοξική επίδραση των βαρέων μετάλλων χαλκού και ψευδαργύρου (οξεία τοξικότητα σε έκθεση για 24 και 96 ώρες), στο DNA των ηπατοκυττάρων ψαριού με τη μοριακή τεχνική, «ανάλυση κομητών» (comet assay) και η επίδρασή τους στους μηχανισμούς επιδιόρθωσης των κυττάρων.

Η ανάλυση κομητών ή “comet assay” ή “single – cell gel” (SCG), είναι μια τεχνική ανίχνευσης του κερματισμένου DNA σε απομονωμένα κύτταρα, σε μικρο-γέλη ηλεκτροφόρηση. Ονομάζεται έτσι λόγω του χαρακτηριστικού σχήματος που παρατηρείται, σε περίπτωση μεγάλης έκτασης βλάβης, κατά την έξοδο του κερματισμένου DNA από τον πυρήνα και το κύτταρο και τη μετακίνησή του προς την άνοδο.

Ο κομήτης που παρατηρείται κατά την ανάλυση της εικόνας αποτελείται από κεφαλή και ουρά. Η περιοχή της κεφαλής αντιπροσωπεύει το

DNA που δε μεταναστεύει έξω από τον πυρήνα, ενώ στην ουρά βρίσκονται θραύσματα του DNA που εξέρχονται από τον πυρήνα και το κυτταρικό σώμα. Ανάλογα με τις συνθήκες, ελέγχεται αν η βλάβη αφορά το μονόκλωνο ή δίκλωνο DNA. Σε αλκαλικό περιβάλλον γίνεται η αποπεριέλιξη και η μετουσίωση του DNA και ανιχνεύεται η βλάβη στο μονόκλωνο, ενώ σε ουδέτερο, δε λαμβάνει χώρα η μετουσίωση, και επομένως, ανιχνεύονται οι βλάβες της διπλής αλυσίδας. Η λύση των κυττάρων γίνεται σε ουδέτερο ή αλκαλικό περιβάλλον και η συνδεόμενες στο DNA πρωτεΐνες απομακρύνονται, ώστε να μην παρεμβάλλονται κατά τη μετανάστευση στο ηλεκτρικό πεδίο. Η έκπλυση του πηκτώματος σε διαλύματα κατάλληλου pH συντελεί στην απομάκρυνση και άλλων ιόντων, που ενδεχομένως μεταβάλλουν τις συνθήκες της ηλεκτροφόρησης.

Δεδομένου ότι το ποσό του DNA είναι ανάλογο της έντασης φθορισμού και σε συνδυασμό με τη χρήση ειδικών λογισμικών, είναι δυνατή η εκτίμηση της βλάβης του DNA, με τη βοήθεια ορισμένων παραμέτρων όπως: η ποσοστιαία αναλογία των κυττάρων με ουρά, η εκατοστιαία αναλογία του DNA στην ουρά και το μήκος της ουράς.

2. Υλικά και μέθοδοι

2.1 *Sparus aurata* (Τσιπούρα)

Το ψάρι που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία ήταν η τσιπούρα (*Sparus aurata*), η ακριβής κατάταξη του οποίου είναι η παρακάτω (Εικόνα 1):

Συνομοταξία : Χορδωτά

Υποσυνομοταξία : Σπονδυλωτά

Ομοταξία : Οστεϊχθύες

Υφομοταξία (κλάση) : Ακτινοπτερύγιοι

Υπέρταξη: Τελεόσταιοι

Τάξη: PERCIFORMES

Οικογένεια: SPARIDAE

Γένος: *Sparus*

Είδος: *Sparus aurata* (Linnaeus, 1758)



Εικόνα 1: Τσιπούρα (*Sparus aurata*).

Τα άτομα του είδους εκτέθηκαν στην παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων ιόντων μετάλλου χαλκού, Cu (0,1-0,5 ppm) και ψευδαργύρου, Zn (0,2-1,0 ppm) για χρονικό διάστημα 24 και 96 ωρών.

Η τσιπούρα (*Sparus aurata*, Linnaeus 1758) είναι κατεξοχήν ευρύαλο και ευρύθερμο είδος και ανήκει στην οικογένεια των Sparidae. Η βαθυμετρική κατανομή φτάνει για τα μεν ιχθύδια τα 30 μέτρα και για τα ενήλικα άτομα τα 150 μέτρα. Η χωρική κατανομή στον Ατλαντικό περιορίζεται μέχρι τα Κανάρια νησιά και το Cape Verde, ενώ σποραδικές εμφανίσεις αναφέρονται μέχρι και τις ακτές της Μ. Βρετανίας και τη Μαύρη θάλασσα (Bauchot and Hureau, 1986). Η διατροφή της στηρίζεται σε δίθυρα και καρκινοειδή (Breber and Strada, 1995). Παρουσιάζει προτίμηση στις λιμνοθάλασσες και σε παράκτια συστήματα με αμμώδεις βυθούς και με λειμώνες Ποσειδωνίας (*Posidonia oceanica*) (Fischer *et al.*, 1987) (Εικόνα 2). Πολύ συχνά παρατηρούνται άτομα να σκάβουν την άμμο με το κεφάλι τους για την εύρεση της τροφής. Μετακινείται σε βαθύτερα νερά κατά την περίοδο της αναπαραγωγής τέλη φθινοπώρου με χειμώνα. Τα ενήλικα άτομα επιστρέφουν στα ρηχά αμέσως μετά την αναπαραγωγή, ενώ αργότερα επιστρέφει ο γόνος που παραμένει μέχρι τη σεξουαλική ωρίμανση.



Εικόνα 2: Περιοχή κατανομής *S. aurata* των άγριων πληθυσμών (κόκκινο) και των χωρών παραγωγής (πράσινο) (Chavanne *et al.*, 2008).

Στη Μεσόγειο και τη Μαύρη θάλασσα, η οικογένεια των *Sparidae* αντιπροσωπεύεται από 26 είδη συμπεριλαμβανομένων και δύο ειδών με προέλευση την Ερυθρά θάλασσα που εγκαταστάθηκαν στην λεκάνη της ανατολικής Μεσογείου λόγω της διάνοιξης της διώρυγας του Σουέζ. Η εκτροφή της τσιπούρας γίνεται σε λίμνες με υφάλμυρο ή θαλασσινό νερό και σε λιμνοθάλασσες. Η μαζική παραγωγή όμως, γίνεται σε κλωβούς διαφόρων μεγεθών και τύπων στη θάλασσα. Πολλές Μεσογειακές χώρες εκτρέφουν τσιπούρα, με την Ελλάδα την Τουρκία και την Ισπανία να παράγουν το 70% της συνολικής μεσογειακής παραγωγής. Τα τελευταία 35 χρόνια η εκτροφή τσιπούρας γνώρισε άνθηση. Σημαντικός στόχος είναι η αύξηση της παραγωγής και η βελτίωση της ποιότητας της εκτρεφόμενης τσιπούρας για την κάλυψη της ολοένα αυξανόμενης παγκόσμιας ζήτησης σε υψηλής ποιότητας πρωτεΐνες, σε συνδυασμό με τα αρνητικά αποτελέσματα της υπεραλίευσης. Αυτή η επιτυχία είναι αποτέλεσμα των προγραμμάτων έρευνας

κι ανάπτυξης των χωρών της περιοχής, σε συνδυασμό με την ισχυρή ζήτηση της αγοράς.

Το είδος παρουσιάζει τα ακόλουθα χαρακτηριστικά (Εικόνα 1): Το σώμα του ψαριού είναι ατρακτοειδές ελαφρώς ωοειδές–κυκλικό και έχει αργυροκίτρινο χρωματισμό στον οποίο διακρίνονται ελαφρά κάθετες λεπτές γκρίζες γραμμές. Στο μπροστινό μέρος του κεφαλιού και πάνω από τα μάτια υπάρχει μία λεπτή, έντονη, κίτρινη λωρίδα στην οποία οφείλει τα ονόματα *Chrysophrys auratus* (Linnaeus, 1758) και *Chrysophrys crassirostris* (Valenciennes, 1830). Το στόμα της τσιπούρας έχει ισχυρά χείλη, οι σιαγόνες στο πρόσθιο τμήμα τους χαρακτηρίζονται από την παρουσία 6 κυνοειδούς μορφής δοντιών, ενώ πλευρικά υπάρχουν στην άνω σιαγόνα 4-5 γομφιοειδούς μορφής δόντια και στην κάτω 3-4 σειρές ιδίου τύπου. Στο άνω μέρος του βραγχιακού επικαλύμματος υπάρχει μια κηλίδα στο χρώμα σκουριάς. Το ραχιαίο πτερύγιο είναι μακρύ, αρχίζει από την βάση σχεδόν των θωρακικών και τελειώνει πριν από το τέλος του εδρικού. Το εξωτερικό περίβλημα της τσιπούρας καλύπτεται ως επί το πλείστον από μικρά λεπτά λέπια. Η διάταξή τους γίνεται με μερική αλληλοκάλυψη. Το είδος είναι ερμαφρόδιτο. Το φαινόμενο του ερμαφροδισμού παρουσιάζεται με πρωτανδρία και η γονιμοποίηση είναι εξωτερική. Κατά τον Barnabe, (1990) και σύμφωνα με παρατηρήσεις από εκτροφές οι ανεκτοί παράγοντες του περιβάλλοντος για το είδος οι οποίοι επηρεάζουν την εξάπλωση του είδους είναι :

Θερμοκρασία. Ως ευρύθερμο είδος η τσιπούρα, απαντάται το χειμώνα σε θερμοκρασίες 5 °C - 6 °C και το καλοκαίρι σε θερμοκρασίες έως 25 °C - 27 °C. Μέγιστη θερμοκρασία επιβίωσης είναι οι 34 °C ενώ η ελάχιστη οι 5 °C.

Αλατότητα. Ως ευρύαλο είδος η τσιπούρα, απαντάται σε νερά με αλατότητα 7 psu έως και 42 psu . Πάντως οι ιδανικές συνθήκες είναι μεταξύ 25 psu και 42 psu.

Διαλυμένο οξυγόνο. Καθώς στο φυσικό περιβάλλον στην θάλασσα το οξυγόνο βρίσκεται σχεδόν πάντα κοντά στο επίπεδο κορεσμού, σπανίως παρατηρούνται μαζικοί θάνατοι του είδους από πτώση του διαλυμένου οξυγόνου στο φυσικό περιβάλλον. Το γεγονός αυτό φυσικά δεν ισχύει στις λιμνοθάλασσες. Πάντως σε συνθήκες εκτροφής έχουν μετρηθεί συγκεντρώσεις οξυγόνου μέχρι το λιγότερο 3,5mg/L , σε θερμοκρασία γύρω στους 25 °C χωρίς να παρουσιαστούν θάνατοι. Σε κάθε περίπτωση το ιδανικό επίπεδο κορεσμού του νερού σε διαλυμένο οξυγόνο σε συνάρτηση με την θερμοκρασία είναι το 90% (Barnabe, 1990).

Θολερότητα. Η τσιπούρα δε φαίνεται να προτιμά τα θολά νερά των εκβολών των ποταμών ή των παράκτιων περιοχών κατά τις θαλασσοταραχές. Δεδομένου ότι η ρύπανση των θαλασσών και των ποταμών με βαρέα μέταλλα είναι μια δυναμική διεργασία και τα ψάρια είναι οι ιδανικοί οργανισμοί δείκτες της ρύπανσης. Σε συνδυασμό με τη διατροφική και εμπορική αξία που έχει η τσιπούρα, και το ότι είναι παράκτιο είδος (όπου η ανθρώπινη δραστηριότητα είναι έντονη).

2.2 Ιχθύες και συνθήκες εκτροφής

Την περίοδο Φεβρουάριος-Ιούνιος 2008, 320 άτομα τσιπούρας με μήκος 12-16 cm και βάρος 60-90 g προερχόμενα από ιχθυοκαλλιέργεια της περιοχής του βόρειου Ευβοϊκού κόλπου, διατηρήθηκαν σε οκτώ δεξαμενές

θαλασσινού νερού κλειστού κυκλώματος. Για το μέρος του πειράματος που αφορούσε τη δειγματοληψία των ψαριών που εκτέθηκαν στα βαρέα μέταλλα χρησιμοποιήθηκαν τυχαία δύο δεξαμενές και επιπλέον δύο για τη δειγματοληψία του μάρτυρα 500 λίτρων η καθεμία. Οι εγκαταστάσεις που εκτελέστηκε το πείραμα ήταν του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας στο Φυτόκο (Εικόνα 3). Οι συνθήκες κατά τη διάρκεια του πειράματος ήταν οι κάτωθι:

Ιχθυοφόρτιση: 4kg/m^3 ,

Θερμοκρασία: $17\text{-}20^\circ\text{C}$,

Οξύτητα: pH 7,4,

Συγκέντρωση αμμωνίας (NH_3): 0,5-2 ppm,

Αλατότητα: 34 psu,

Διαλυμένο οξυγόνο: 5-7 ml/ L.

Η ιχθυοφόρτιση διατηρήθηκε σταθερή σε όλες τις δεξαμενές. Η διάρκεια προσαρμογής τους ήταν τρεις εβδομάδες και στη συνέχεια τα εκτρεφόμενα άτομα σιτίζονταν με βιομηχανική τροφή (βιομάρ 3mm και 4,5 mm) δύο φορές την ημέρα από 7 g τη φορά ανά δεξαμενή.

Ο τύπος δεξαμενών που χρησιμοποιήθηκε για την διεξαγωγή αυτού του πειράματος ήταν κυλινδρικές δεξαμενές, οι οποίες έχουν ένα κεντρικό σημείο απορροής του νερού στη βάση τους και η είσοδος του νερού αυτού γινόταν συνήθως υπό πίεση από κάποιο σημείο της περιφέρειάς τους (Εικόνα 4). Χαρακτηριστικό αυτών των κυλινδρικών δεξαμενών είναι ότι στο κέντρο της δεξαμενής, στην οποία η κυκλοφορία του νερού είναι φτωχή, δημιουργείται μια δακτυλιοειδής «νεκρή ζώνη». Αυτό έχει ως αποτέλεσμα να υπάρχει διαφορετική ταχύτητα του νερού σε διαφορετικά σημεία της δεξαμενής. Πιο συγκεκριμένα, στα μεσαία στρώματα βάθους η ταχύτητα του

νερού είναι η μέγιστη δυνατή στα περιφερειακά τμήματα, μέτρια κοντά στην απορροή και ελάχιστη στο κέντρο της δεξαμενής. Αυξάνοντας, είτε την πίεση του νερού που διοχετεύεται στην είσοδο, είτε το βάθος της δεξαμενής, το μέγεθος της νεκρής ζώνης και ο βαθμός στασιμότητας του νερού μπορούν να μειωθούν. Τέλος, οι κυλινδρικές δεξαμενές είναι εν μέρει αυτοκαθαριζόμενες. Αυτό οφείλεται στη μείωση της ταχύτητας του νερού από τα περιφερειακά τμήματα προς το κέντρο με αποτέλεσμα, τα στερεά να κινούνται στο κεντρικό σημείο της αποχέτευσης και να παρασύρονται από το στόμιο της απορροής στο κέντρο της δεξαμενής.

Πριν χρησιμοποιηθεί το κύκλωμα οι δεξαμενές και οι σωληνώσεις, καθαρίστηκαν με ξύδι και νερό, απολυμάνθηκαν με διάλυμα χλωραμίνης και εκπλύθηκαν με νερό.

Για την τεχνητή οξυγόνωση του νερού δύο αεραντλίες δούλευαν εναλλάξ ανά μία ώρα, με την βοήθεια χρονοδιακόπτη, οι δεξαμενές στην περίμετρό τους, περιείχαν αεριστήρες διάχυσης αέρα (αερόπετρες), παρέχοντας μικρή ανάδευση της στήλης του νερού. Οι τιμές του διαλυμένου οξυγόνου, καταγράφονταν με τη χρήση οξυγονόμετρου (Hanna hi 9143). Η ικανότητα ανανέωσης του νερού γινόταν με τη βοήθεια δύο αντλιών, συνδεδεμένων παράλληλα με την παροχή να είναι της τάξης των $2 \text{ m}^3/\text{h}$ περίπου. Αλλαγή του νερού και καθαρισμός των δεξαμενών γίνονταν όταν αυτή κρινόταν σκόπιμη ανά τακτικά χρονικά διαστήματα, κατά μέσο όρο δύο φορές την εβδομάδα. Η αλατότητα μετριοτάνα δύο φορές τη βδομάδα και κυμαινόταν από 34 σε 37 psu (αλατόμετρο WTW LF 330). Οι ακραίες τιμές της θερμοκρασίας του νερού κατά τη διάρκεια της μελέτης από το ελάχιστο των 17°C το Φεβρουάριο, αυξήθηκε σταδιακά στο ετήσιο μέγιστο των 20°C

τον Ιούνιο. Οι τιμές του pH και της αμμωνίας κυμάνθηκαν σε φυσιολογικά επίπεδα. Για τη μέτρηση των επιπέδων αμμωνίας χρησιμοποιήθηκε το τεστ NH₃/NH₄ TETRA TEST. Για να διασφαλισθεί η ποιότητα του νερού, το νερό μεταφέρεται μέσω των αντλιών σε ειδικό σύστημα διήθησης (Tetra Pond PF 10.000), όπου διηθούνται 2 m³/h θαλασσινού νερού (Εικόνα 5). Το φίλτρο αποτελείται:

- α) Από στερεό υπόστρωμα (αστεράκια) για να προάγεται η ανάπτυξη ειδικών βακτηρίων που απομακρύνουν την τοξική αμμωνία από το νερό μετατρέποντας την στα σχετικά λιγότερα επικίνδυνα νιτρικά. Πριν την έναρξη του πειράματος προστέθηκαν βακτήρια με αργό και σύντομο ρυθμό αύξησης (χρόνος διπλασιασμού 12-32h) και (χρόνος διπλασιασμού 1-2h) αντίστοιχα, για την ανάπτυξη πληθυσμού ικανού για τη δέσμευση της παραγόμενης αμμωνίας.
- β) λαμπτήρας UV για την αποστείρωση του θαλασσινού νερού από παθογόνα μικρόβια
- γ) φίλτρο άνθρακα για την κατακράτηση των ιόντων χλωρίου και τον καθαρισμό του νερού και
- δ) μία στρώση υαλοβάμβακα για τη κατακράτηση των μεγαλύτερων σωματιδίων τα οποία μπορεί να προέρχονται είτε από τα υπολείμματα της τροφής, είτε από τα περιττώματα των ψαριών.

Οι ιχθύες πριν την εισαγωγή τους στις δεξαμενές εμβαπτίστηκαν σε διάλυμα χλωραμίνης συγκέντρωσης 2-3 ppm για την απολύμανσή τους από τυχόν παθογόνους μικροοργανισμούς και στη συνέχεια εκπλύθηκαν με καθαρό θαλασσινό νερό πριν μεταφερθούν στις δεξαμενές. Πριν το στάδιο έκθεσης των ιχθύων σε συγκεντρώσεις χαλκού 0,1 και 0,5 ppm και

ψευδαργύρου 0,2 και 1,0 ppm, μέρος αυτών (40 άτομα) προερχόμενα τυχαία από τις δύο δεξαμενές του κυκλώματος, μεταφέρθηκαν σε εξωτερικές, αεριζόμενες δεξαμενές όπου και παρέμειναν στις συγκεντρώσεις των παραπάνω μετάλλων για διάστημα 24ων και 96 ωρών μέχρι τη δειγματοληψία. Την ημέρα πριν τη μεταφορά τους και μέχρι τη δειγματοληψία τους παρέμειναν άσιτα.



Εικόνα 3. Γενική εξωτερική άποψη του εργαστηρίου.



Εικόνα 4. Γενική άποψη του εσωτερικού του σταθμού - συστοιχίες δεξαμενών των 500 L.



Εικόνα 5. Το μηχανικό, χημικό και βιολογικό φίλτρο.

2.3 Δειγματοληψία

Μετά την πάροδο των 24 και 96 ωρών από την έκθεση σε χαλκό και ψευδάργυρο, για κάθε μεταχείριση, έξι άτομα τσιπούρας (δύο επαναλήψεις), συλλέχθηκαν τυχαία και μεταφέρθηκαν σε δοχείο που περιείχε διαλυμένη ποσότητα αναισθητικού για τη θανάτωσή τους. Επιτόπου, αμέσως μετά την θανάτωση, τα άτομα μετρήθηκαν, ζυγίστηκαν και έγινε εκτομή για την αφαίρεση του ήπατος (Εικόνες 6,7). Οι ιστοί, άμεσα μεταφέρθηκαν σε δοκιμαστικούς σωλήνες τύπου «Falcon» που περιείχαν ρυθμιστικό διάλυμα HBSS (Hank's salt solution) και τοποθετήθηκαν πάνω στο πάγο μέχρι να μεταφερθούν στο εργαστήριο για την απομόνωση των ηπατοκυττάρων. Το διάλυμα HBSS είναι ελεύθερο ασβεστίου και μαγνησίου. Το ασβέστιο επιδρά ανασταλτικά στο διαχωρισμό των κυττάρων του ιστού, ενώ το μαγνήσιο αναστέλλει τη δράση της κολλαγονάσης (Baksi and Frazier, 1990).



Εικόνα 6. Μέτρηση μήκους



Εικόνα 7. Μέτρηση βάρους

2.3.1 Απομόνωση ηπατοκυττάρων

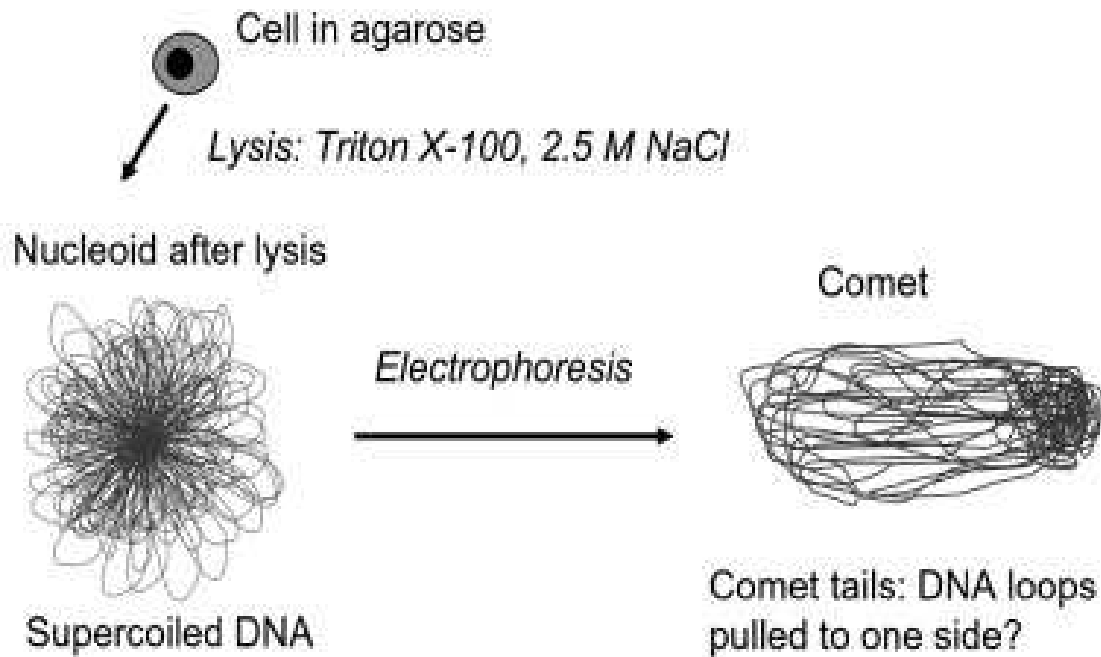
Η διαδικασία απομόνωσης κυττάρων που ακολουθήθηκε στη συγκεκριμένη εργασία περιλάμβανε δύο στάδια (Baksie and Fazier, 1990: Devaux *et al.*, 1997: Mitchelmore and Chipman, 1998): Στο πρώτο στάδιο, γίνεται ο καθαρισμός του ιστού με διαδοχικές πλύσεις με το ρυθμιστικό διάλυμα HBSS ελεύθερο ασβεστίου-μαγνησίου (Ca ή Mg) και στο δεύτερο, λαμβάνει χώρα η αφομοίωση του ήπατος. Αμέσως μετά τον καθαρισμό του ιστού, εφαρμόζονται ενέσεις κολλαγονάσης (CLS, type I) συγκέντρωσης 0,04% (κολλαγονάση σε διάλυμα HBSS). Η κολλαγονάση είναι ένα ένζυμο το οποίο βοηθάει στον να αφομοιωθεί ο ιστός του ήπατος. Αφού γίνει η «πέψη» του ιστού για 15 λεπτά, το ήπαρ μεταφέρεται σε δισκίο “petri”, όπου και τεμαχίζεται σε μικρά τμήματα. Η όλη διαδικασία λαμβάνει χώρα πάνω σε τριμμένο πάγο. Όλο το τεμαχισμένο ήπαρ μαζί με το διάλυμα HBSS, το οποίο περιέχει κολλαγονάση, μεταφέρεται σε μικρό γυάλινο δοχείο ζέσεως και τοποθετείται πάνω σε μηχανήμα ανάδευσης για μισή ώρα. Στη συνέχεια, το περιεχόμενο του δοχείου μεταφέρεται σε δοκιμαστικό σωλήνα τύπου

«Falcon», αφού πρώτα φιλτραρισθεί με αποστειρωμένη γάζα. Ακολουθεί φυγοκέντριση του αιωρήματος των κυττάρων στις 2.000 στροφές για πέντε λεπτά και μετά την αφαίρεση του υπερκείμενου κρατείται το pellet, και προστίθεται φρέσκο διάλυμα HBSS. Ακολουθούν δύο διαδοχικές πλύσεις με HBSS (φυγοκέντριση στις 2,000 στροφές για πέντε λεπτά) και τέλος το εναπομείναν pellet διαλύεται σε 7 – 10 ml ρυθμιστικού διαλύματος PBS (phosphate buffered saline). Η ποσότητα του διαλύματος PBS που προστίθεται υπολογίζεται ώστε η τελική συγκέντρωση των βιώσιμων κυττάρων να είναι 100.000/ml. Ο υπολογισμός του αριθμού των βιώσιμων κυττάρων γίνεται με χρώση ηωσίνης συγκέντρωσης 4% (5μl χρωστικής σε περίπου 45 μl κυτταρικού αιωρήματος) και καταμέτρησή τους σε αντικειμενοφόρο πλάκα Neubauer.

2.4 Ανάλυση κομητών (Comet assay)

Η ανάλυση κομητών ή comet assay (ή single – cell gel) είναι μια αρκετά ευαίσθητη τεχνική που επιτρέπει την ανίχνευση της βλάβης του DNA σε επίπεδο απομονωμένων κυττάρων. Σ' αυτή τη τεχνική της μικρο-γέλης ηλεκτροφόρησης, ένας μικρός αριθμός κυττάρων, όπως κύτταρα που προέρχονται από καλλιέργειες ή κύτταρα που απομονώνονται από διάφορους ιστούς, τοποθετούνται με τη μορφή αιωρήματος σε λεπτό στρώμα αγαρόζης πάνω σε αντικειμενοφόρο πλάκα. Τα κύτταρα λύνονται από διάλυμα κορεσμένο σε άλας NaCl. Σχηματίζονται πυρήνες αποτελούμενοι από μη νουκλεοσωμικό αλλά υπερελικωμένο DNA. Ακολουθώντας της ηλεκτροφόρησης και της χρώσης τους με τη φθορίζουσα ουσία, βρωμιούχο αιθίδιο (EtBr), τα

κύτταρα με βλάβη στο DNA, εμφανίζουν αυξημένη μετανάστευση του κερματισμένου χρωμοσωμικού DNA από τον πυρήνα προς την άνοδο, λαμβάνοντας το σχήμα του κομήτη (Σχήμα 1). Η εφαρμογή της μεθόδου σε αλκαλικό περιβάλλον είναι η πιο συχνή και το ποσοστό των θραυσμάτων που μεταναστεύουν, είναι ανάλογο της βλάβης του DNA. Μεταξύ των παραμέτρων που χρησιμοποιούνται για την εκτίμηση του ποσοστού του κερματισμένου DNA, είναι η εκατοστιαία αναλογία του DNA στην ουρά του κομήτη, η εκατοστιαία αναλογία του DNA στον πυρήνα, το μήκος της ουράς, η διάμετρος του πυρήνα, το συνολικό μήκος του κομήτη και η παράμετρος TM-Tail Moment, όπου ορίζεται ως το γινόμενο του μήκους της ουράς, επί το ποσοστό του DNA στην ουρά του κομήτη και η οποία χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία ως μέτρο κερματισμού το DNA.



Σχήμα 1: Σχηματική αναπαράσταση του δημιουργίας κομήτη κατά το στάδιο της ηλεκτροφόρησης. Εφαρμογή της ανάλυσης κομητών (comet assay) σε ουδέτερο περιβάλλον. Από αριστερά: Απομονωμένος πυρήνας με υπερελικωμένο DNA. Μετά την έκθεση σε κορεσμένο διάλυμα άλατος (αποπεριέλιξη) επέρχεται χάλαση του DNA, με αποτέλεσμα οι βρόγχοι να εκχύνονται από τον πυρήνα και να σχηματίζουν "φωτοστέφανο". Όταν οι πυρήνες με χαλαρωμένο DNA υπόκεινται σε ηλεκτροφόρηση, αρνητικά φορτισμένα κομμάτια ή βρόγχοι φθαρμένου DNA μετακινούνται στο ηλεκτρικό πεδίο προς την άνοδο και σχηματίζεται μια εικόνα παρόμοια με κομήτη (Shaposhnikov *et al.*, 2008).

2.4.1 Αλκαλική μικρο-γέλη ηλεκτροφόρηση

Η αλκαλική εκδοχή της μεθόδου “comet assay” εφαρμόστηκε από τους Singh *et al.*, (1988), εκτελώντας ηλεκτροφόρηση σε $\text{pH} > 13,0$, κατέστη δυνατή η ανίχνευση θραυσμάτων μονόκλωνου DNA. Άλλες εκδοχές της μεθόδου αναπτύχθηκαν από τον Olive, (1989) που περιλάμβανε τη λύση των κυττάρων σε αλκαλικό pH , και στη συνέχεια ηλεκτροφόρηση είτε σε ουδέτερο είτε σε ελαφρώς αλκαλικό περιβάλλον ($\text{pH} 12,1$), για την ανίχνευση θραυσμάτων δίκλωνου ή μονόκλωνου DNA αντίστοιχα. Επειδή οι περισσότεροι τοξικοί παράγοντες που επηρεάζουν το DNA, προκαλούν περισσότερες και πιο εκτεταμένες βλάβες σε τμήματα στον έναν από τους δύο κλώνους απ’ ότι στις ίδιες θέσεις στο δίκλωνο μόριο, η αλκαλική εκδοχή της μεθόδου ($\text{pH} > 13$) είναι πιο ευαίσθητη στην ανίχνευση της βλάβης του DNA.

Ένα ευρύ φάσμα τοξικών παραγόντων προκαλεί αύξηση της μετανάστευσης του DNA έξω από το κυτταρικό σώμα, μέσα στο πήκτωμα της αγαρόζης. Εγκοπές που εισάγονται στο μόριο του DNA, είτε από τη δράση ενδονουκλεασών των μηχανισμών επιδιόρθωσης είτε απευθείας από γενοτοξικούς παράγοντες, προκαλούν θραύσματα ή χάλαση του υπερελικωμένου DNA. Τα θραύσματα και οι θηλιές (χαλαρωμένο DNA) μπορούν να μεταναστέψουν προς την άνοδο σχηματίζοντας κατ’ αυτό τον τρόπο την ουρά του κομήτη. Οι αλκαλικές συνθήκες επιτρέπουν την αποπεριέλιξη και τη μετουσίωση του δίκλωνου DNA αποκαλύπτοντας τις ενδεχόμενες εγκοπές στο μόριο, προκαλώντας έτσι τη δημιουργία θραυσμάτων. Η μέθοδος δεν ανιχνεύει μόνο τις βλάβες που προκαλούνται στο DNA από την ιονίζουσα ακτινοβολία ή αντίστοιχες χημικές ενώσεις, αλλά

και αυτές που προκαλούνται από το υπεροξείδιο του υδρογόνου, τις ελεύθερες ρίζες, τους αρωματικούς υδρογονάνθρακες (PAHs), διάφορες χημικές ουσίες, τα βαρέα μέταλλα και την υπεριώδη ακτινοβολία (Tice R. 1995). Επιπρόσθετα είναι άμεσα ανιχνεύσιμη η θραύση του μορίου που προκαλείται από διαδικασίες που εισάγουν εγκοπές στον ένα κλώνο όπως κατά την επιδιόρθωση εκτομής, η οποία σε ορισμένες περιπτώσεις, π.χ. UV, PAHs, φαίνεται να παίζει σημαντικό ρόλο (Speit and Hartmann, 1995).

Επιπλέον βλάβη του DNA σε ειδικές αλληλουχίες βάσεων μπορούν να ανιχνευθούν σε συνδυασμό της μεθόδου με ειδικές ενδονουκλεάσες (ένζυμα περιορισμού). Μετά τη λύση των κυττάρων, η εφαρμογή των προαναφερθέντων ενζύμων προσβάλουν φωσφοδιεστερικούς δεσμούς που περιβάλλονται από εξειδικευμένες αλληλουχίες βάσεων και τα παραγόμενα θραύσματα μετρούνται μέσω της τεχνικής. Οξειδωμένες βάσεις DNA ανιχνεύτηκαν με πολλή μεγάλη ευαισθησία με τη βοήθεια της ενδονουκλεάσης III ή το ένζυμο formamidopyrimidine- DNA- glycosylase (FPG) *in vivo* και *in vitro* (Collins *et al.*, 1993: Dennog *et al.*, 1996). Άλλοι τύποι βλαβών του DNA, όπως ο σχηματισμός διμερών μεταξύ πυριμιδίνων, μπορούν να ανιχνευτούν εφαρμόζοντας την τεχνική έμμεσου ανοσοφθορισμού με τη χρήση μονοκλωνικών αντισωμάτων (Sauvaigo *et al.*, 1998). Ο συνδυασμός της comet assay με τη FISH (fluorescence in situ hybridization) καθιστά δυνατή τη μελέτη της επαγωγής και διατήρησης της βλάβης του DNA σε ειδικές περιοχές στα χρωμοσώματα και στα γονίδια. (Santos *et al.*, 1997, Rapp *et al.*, 2000).

Σύνδεση μεταξύ των μορίων DNA και DNA-πρωτεϊνών μπορούν να προκαλέσουν προβλήματα στην εφαρμογή της μεθόδου, επειδή

σταθεροποιείται το χρωμοσωμικό DNA και εμποδίζει την μετανάστευσή του (Hartmann *et al.*, 1995). Η τεχνική της «ανάλυσης κομητών» βρίσκει εφαρμογή στην ανίχνευση αυτών των δεσμών. Ένας τρόπος είναι η πρόκληση θραυσμάτων και κατά συνέπεια η επαγωγή της μετανάστευσης του DNA με ένα δεύτερο παράγοντα (π.χ. ιονίζουσα ακτινοβολία) και η σύγκρισή της με τη μετανάστευση που προκαλείται με την παρουσία του παράγοντα που προκαλεί τους δεσμούς μεταξύ των μορίων DNA και DNA-πρωτεϊνών (Pfuhler *et al.*, 1996, Merk *et al.*, 1998). Επιπλέον η παράταση του χρόνου μετουσίωσης ή/και του χρόνου της ηλεκτροφόρησης, επιτρέπει τη σύγκριση της μετανάστευσης του DNA και επομένως την ανίχνευση ύπαρξης των προαναφερθέντων δεσμών. Η διάκριση DNA-DNA και DNA-πρωτεϊνών δεσμών μπορεί να γίνει με την εφαρμογή της πρωτεϊνάσης K (PK) στα λυμένα κύτταρα πριν την ηλεκτροφόρηση. Η PK διασπά τους δεσμούς μεταξύ DNA και πρωτεϊνών, ενώ δεν έχει επίδραση στους δεσμούς DNA-DNA (Fusco *et al.*, 1996).

2.4.2 Επίστρωση αгарόζης σε αντικειμενοφόρο πλάκα

Μετά την απομόνωση των ηπατικών κυττάρων, ακολούθησε η τοποθέτησή τους με τη μορφή αιωρήματος (20μL) σε λεπτή στρώση αгарόζης πάνω σε αντικειμενοφόρο πλάκα. Προηγουμένως, η αντικειμενοφόρος πλάκα είχε εμβαπτισθεί σε καθαρή αλκοόλη και στη συνέχεια τοποθετήθηκε στους -20 °C για 20 λεπτά. Πήκτωμα αгарόζης (NMP Normal Melting Point) συγκέντρωσης 0,5% παρασκευάστηκε σε διάλυμα PBS. Μετά την ανάδευσή και την ομογενοποίηση του, το διάλυμα τοποθετήθηκε σε

φούρνο μικροκυμάτων για μικρό χρονικό διάστημα (5 λεπτά) μέχρι να διαυγασθεί πλήρως. Αφού στέγνωσε η αντικειμενοφόρος πλάκα από την αιθανόλη, εμβαπτίστηκε στη ζεστή αгарόζη ($>60^{\circ}\text{C}$) για σύντομο χρονικό διάστημα (3-4 sec), ώστε να επικαθήσει στην κρύα και καθαρή επιφάνεια της. Αμέσως μετά, αφαιρέθηκε από την αгарόζη, καθαρίστηκε προσεχτικά η κάτω επιφάνειά της και τοποθετήθηκε πάνω σε πάγο για να ζελατινοποιηθεί.

Ένα δεύτερο διάλυμα, αгарόζης (LMP Low Melting Point) συγκέντρωσης 0,5% παρασκευάστηκε με τον ίδιο τρόπο, για την ανάμιξή του με το κυτταρικό αιώρημα. Όταν έφτασε σε θερμοκρασία δωματίου ($20-25^{\circ}\text{C}$), 20μl κυτταρικού αιωρήματος προστέθηκαν σε 80μl αгарόζης (LMP) και τοποθετήθηκαν στην αντικειμενοφόρο πλάκα που ήταν καλυμμένη με πήκτωμα αгарόζης και τοποθετήθηκε η καλυπτρίδα. Η αντικειμενοφόρος πλάκα που έφερε τα κύτταρα τοποθετήθηκε σε πάγο για 15 λεπτά. Μετά τη ζελατινοποίηση και της δεύτερης στρώσης αгарόζης, η καλυπτρίδα απομακρύνθηκε με προσοχή.

2.4.3 Λύση, ηλεκτροφόρηση και μέτρηση των κομητών

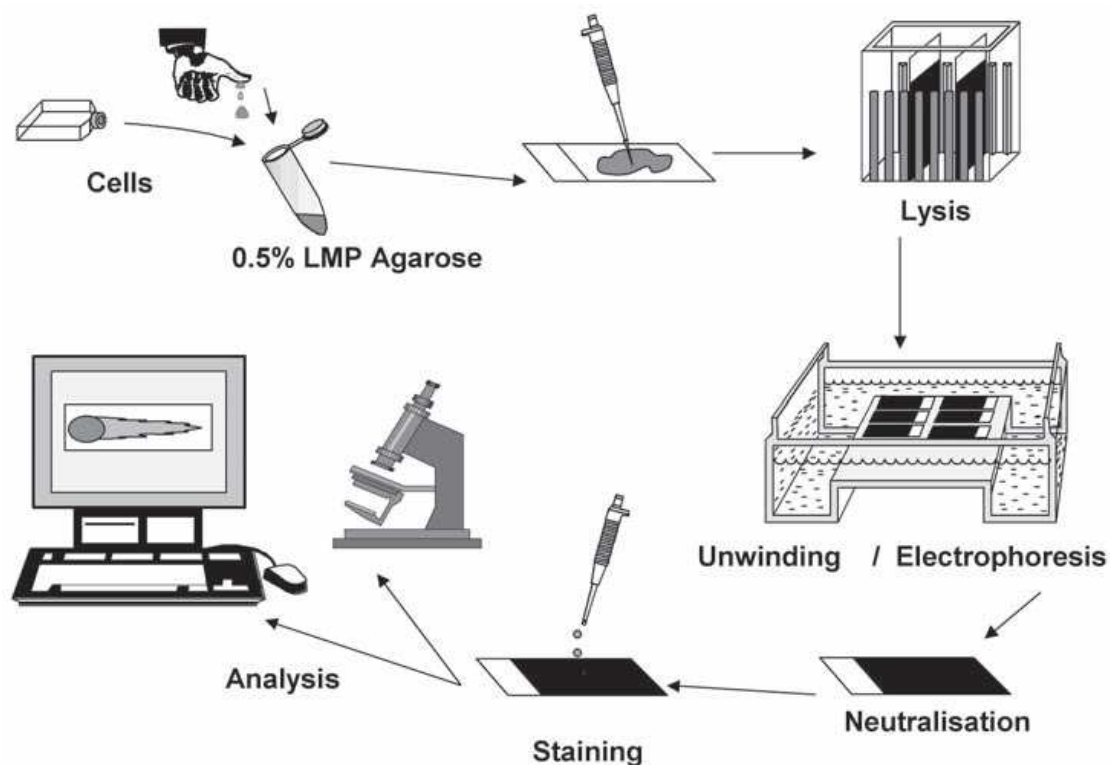
Μετά το τέλος του προηγούμενου σταδίου, η αντικειμενοφόρος πλάκα τοποθετήθηκε σε διάλυμα λύσης. Το διάλυμα περιείχε άλας NaCl συγκέντρωσης 2.5 M, EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid) συγκέντρωσης 100 mM, Tris συγκέντρωσης 10 mM και τέλος προστίθενται 1% Triton – X 100 και 10% DMSO (dimethyl sulfoxide). Στη συνέχεια, το pH του διαλύματος ρυθμίστηκε με συμπυκνωμένο διάλυμα HCl ή NaOH (pH 10) και τοποθετήθηκε στους 4°C για περίπου 30 λεπτά (το κρύο διάλυμα βοηθάει στη

διατήρηση της σταθερότητας της αгарόζης) (Tice *et al.*, 2000). Στο κρύο διάλυμα λύσης, τοποθετήθηκαν οι αντικειμενοφόρες πλάκες (οι οποίες φέρουν τα ηπατικά κύτταρα) και παρέμειναν στους 4 °C για τουλάχιστον μία ώρα. Κατά το ανωτέρω χρονικό διάστημα έλαβε χώρα η λύση των κυττάρων καθώς η κυτταρική μεμβράνη λύεται και το DNA σχηματίζει πυρήνες .

Πριν την ηλεκτροφόρηση, οι αντικειμενοφόρες πλάκες ξεπλύθηκαν με απεσταγμένο νερό και τοποθετήθηκαν στη συσκευή οριζόντιας ηλεκτροφόρησης που περιείχε 1,5 l βασικό διάλυμα (pH>12,1 & 4°C), όπου και παρέμειναν για 15 λεπτά ώστε να πραγματοποιηθεί η αποδιάταξη του DNA που είναι απαραίτητη για την ανίχνευση θραυσμάτων μονόκλωνου DNA. Το παραπάνω διάλυμα παρασκευάστηκε από 0,075 M NaOH και 1 mM EDTA σε απεσταγμένο νερό. Μετά την πάροδο των 15 λεπτών, ξεκίνησε η διαδικασία της ηλεκτροφόρησης σε συνθήκες 25 V, 300 mA για χρονική διάρκεια 15 λεπτών (Mitchelmore and Chipman, 1998).

Μετά την ηλεκτροφόρηση, οι αντικειμενοφόρες πλάκες εκπλύθηκαν με προσοχή σε ουδέτερο διάλυμα (διάλυμα Tris 0,4 M), ώστε το βρωμιούχο αιθίδιο να μπορεί να δράσει κατά το στάδιο της χρώσης (McKelvey-Martin *et al.*, 1993). Σε κάθε αντικειμενοφόρο, προστέθηκαν 50μl βρωμιούχου αιθιδίου συγκέντρωσης 20μg/ml. Εκατό έως εκατόν πενήντα κύτταρα συλλέχθηκαν τυχαία από κάθε αντικειμενοφόρο πλάκα τα οποία αναλύθηκαν σε μικροσκόπιο φθορισμού (Zeiss Axiostar plus) εφοδιασμένο με φίλτρο διέγερσης και αποκοπής στα 515-560nm 590 nm αντίστοιχα, σε μεγέθυνση 40x. Οι εικόνες καταγράφονταν από βιντεοκάμερα υψηλής ανάλυσης και προβάλλονταν σε οθόνη H/Y μέσω του λογισμικού ProgRes Capture Pro 2.1, ενώ η επεξεργασία-ανάλυση των «κομητών» έγινε με το λειτουργικό

πρόγραμμα CASP (Konca *et al.*, 2002). Η διαδικασία συνοψίζεται στο σχήμα 2.



Σχήμα 2. Σχηματική αναπαράσταση των κυριότερων σημείων στην Comet ανάλυση: τα κυτταρικό αιώρημα (cells), οι αντικειμενοφόρες πλάκες με λεπτή στρώση αγαρόζης (slides), η λύση των κυττάρων (lysis), η αποδιάταξη του DNA σε αλκαλικές συνθήκες (alkali unwinding), η ηλεκτροφόρηση (electrophoresis), η έκπληση με ουδέτερο διάλυμα (neutralization), και η χρώση του DNA με βρωμιούχο αιθίδιο (staining) (Tice *et al.*, 2000).

2.5 Επιδιόρθωση

Οι βλάβες αντιμετωπίζονται από τη δράση συστημάτων που τις αναγνωρίζουν και διορθώνουν το DNA. Τα συστήματα επιδιόρθωσης είναι τόσο πολύπλοκα όσο και ο ίδιος ο μηχανισμός αντιγραφής, γεγονός που υποδηλώνει τη σημασία τους για την επιβίωση του κυττάρου. Όταν ένα σύστημα επιδιόρθωσης επιδιορθώνει μια βλάβη στο DNA, οι επιβλαβείς συνέπειες αυτής της αλλαγής αποφεύγονται. Αν όμως αυτό δε συμβεί, μπορεί να προκληθεί μετάλλαξη. Ο παρατηρούμενος αριθμός μεταλλαξιγένεσης αντικατοπτρίζει μια ισορροπία ανάμεσα στον αριθμό των βλαβών που συμβαίνουν στο DNA και στον αριθμό των βλαβών που επιδιορθώθηκαν.

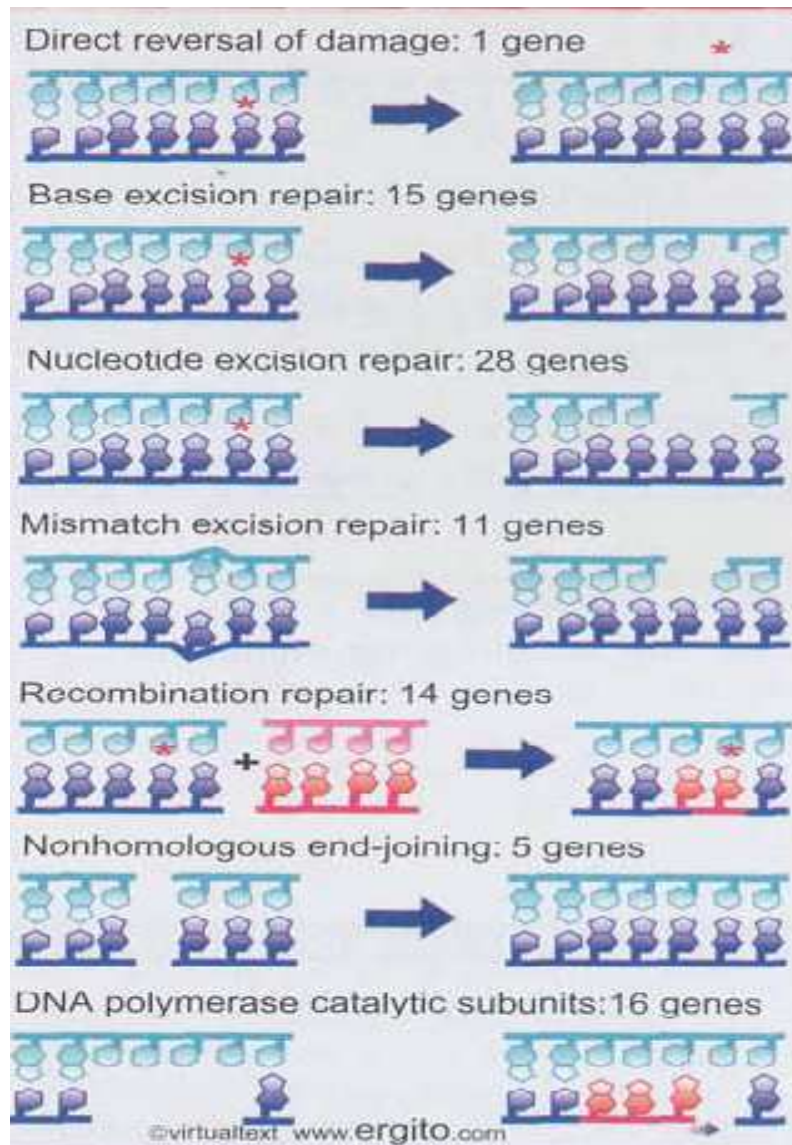
Τα συστήματα επιδιόρθωσης συχνά αναγνωρίζουν διάφορες παραμορφώσεις στο DNA ως ερεθίσματα για να αναλάβουν δράση. Κάθε κύτταρο είναι πιθανόν να διαθέτει πολλά συστήματα που είναι σε θέση να αντιμετωπίζουν βλάβες στο DNA. Η σημασία της επιδιόρθωσης του DNA στους ευκαρυώτες φαίνεται από το γεγονός ότι έχουν ταυτοποιηθεί ήδη περισσότερα από 130 γονίδια επιδιόρθωσης στο ανθρώπινο γονιδίωμα. Μπορούμε να διακρίνουμε τα γονίδια αυτά σε πολλούς γενετικούς τύπους, ανάλογα με τη λειτουργία των προϊόντων τους (Σχήμα 3):

- Κάποια ένζυμα αποκαθιστούν άμεσα συγκεκριμένα είδη βλάβης στο DNA.
- Υπάρχουν μηχανισμοί επιδιόρθωσης που βασίζονται στην εκτομή βάσης, στην εκτομή νουκλεοτιδίων, καθώς και στην επιδιόρθωση αταίριαστων βάσεων. Όλα αυτά τα συστήματα λειτουργούν απομακρύνοντας και αντικαθιστώντας υλικό.

- Υπάρχουν συστήματα που λειτουργούν χρησιμοποιώντας ανασυνδυασμό για την ανάκτηση ενός φυσιολογικού αντιγράφου, το οποίο χρησιμοποιείται για την αντικατάσταση της δίκλωνης αλληλουχίας που έχει υποστεί βλάβη.
- Το μονοπάτι σύνδεσης μη ομόλογων άκρων επανασυνδέει κομμένα δίκλινα άκρα.
- Πολλές διαφορετικές DNA πολυμεράσες είναι δυνατόν να εμπλέκονται στην επανασύνθεση τμημάτων DNA που πρέπει να αντικατασταθούν.

Η άμεση επιδιόρθωση είναι σπάνια και γίνεται με άμεση επαναφορά στη φυσιολογική κατάσταση. Ένα σχετικό παράδειγμα είναι η φωτοενεργοποίηση των διμερών πυριμιδίνης, κατά την οποία οι λανθασμένοι ομοιοπολικοί δεσμοί διασπώνται από ένα φωτοεξαρτώμενο ένζυμο.

Οι αταίριαστες βάσεις ανάμεσα στους κλώνους του DNA είναι ένας από τους σημαντικότερους στόχους για τα συστήματα επιδιόρθωσης. Η επιδιόρθωση αταίριαστου ζεύγους επιτυγχάνεται με τη σάρωση του DNA, ώστε να εντοπιστούν οι βάσεις που δε σχηματίζουν σωστά ζεύγη, παρότι βρίσκονται η μία απέναντι από την άλλη. Σε αταίριαστα ζεύγη που δημιουργούνται κατά την αντιγραφή είναι δυνατόν να γίνει διάκριση ανάμεσα στον «παλαιό» και στον «καινούριο» κλώνο, ώστε κατά προτίμηση να διορθωθεί ο νεοσύστατος κλώνος. Αταίριαστα ζεύγη επίσης σχηματίζονται όταν δημιουργείται ετεροδίκλινο DNA κατά τον ανασυνδυασμό και η διόρθωσή τους είναι δυνατόν να διαταράσσει την αναλογία των γονικών αλληλομόρφων. Άλλα συστήματα αντιμετωπίζουν αταίριαστα ζεύγη που δημιουργούνται από τροποποίηση των βάσεων, όπως με απαμίνωση. Η ση-



Σχήμα 3. Διάφοροι μηχανισμοί επιδιόρθωσης του μορίου του DNA. Από πάνω προς τα κάτω: άμεση υποκατάσταση της βλάβης (direct reversal of damage), επιδιόρθωση εκτομής βάσης (base excision repair), επιδιόρθωση εκτομής νουκλεοτιδίων (nucleotide excision repair), επιδιόρθωση αταίριαστων βάσεων (mismatch excision repair), επιδιόρθωση με ανασυνδυασμό (recombination repair), σύνδεση μη ομόλογων άκρων (non homologous end-joining) και δράση DNA πολυμεράσης (DNA polymerase) (Lewin 2004).

μασία αυτών των συστημάτων υπογραμμίζεται από το γεγονός ότι συχνά ο καρκίνος οφείλεται σε μεταλλάξεις γονιδίων, τα οποία είναι υπεύθυνα για την επιδιόρθωση αταίριαστων ζευγών βάσεων.

Τα αταίριαστα ζεύγη συνήθως διορθώνονται με επιδιόρθωση εκτομής. Στις περιπτώσεις αυτές, το πρώτο βήμα είναι ο εντοπισμός της βλάβης από ένα κατάλληλο ένζυμο, το οποίο έχει την ιδιότητα να αναγνωρίζει βάσεις που έχουν υποστεί βλάβη ή αλλαγές στη δομή του DNA στο χώρο. Υπάρχουν δύο είδη συστημάτων επιδιόρθωσης εκτομής:

- Τα συστήματα επιδιόρθωσης με εκτομή βάσης αντικαθιστούν απευθείας τη βάση που φέρει τη βλάβη. Ένα σχετικό παράδειγμα είναι η DNA γλυκοζυλάση της ουρακίλης, η οποία αφαιρεί ουρακίλες που είναι λανθασμένα ζευγαρωμένες με γουανίνες.
- Τα συστήματα επιδιόρθωσης με εκτομή νουκλεοτιδίων αφαιρούν ένα μικρό μονόκλωνο τμήμα το οποίο περιλαμβάνει τη βάση ή τις βάσεις που φέρουν τη βλάβη και στη συνέχεια συνθέτουν ένα νέο τμήμα DNA για να αντικαταστήσει το υλικό που αφαιρέθηκε. Μερικά αναγνωρίζουν γενικές βλάβες στο DNA, ενώ άλλα δρουν πάνω σε συγκεκριμένα είδη βλάβης. Συχνά, ο ίδιος κυτταρικός τύπος διαθέτει πολλαπλά συστήματα επιδιόρθωσης εκτομής.

Τα συστήματα επιδιόρθωσης με ανασυνδυασμό διαχειρίζονται καταστάσεις στις οποίες η βλάβη παραμένει στο πατρικό μόρια και η συσκευή αντιγραφής έχει αναγκαστεί να παρακάμψει το σημείο στο οποίο βρίσκεται αυτή, συνήθως δημιουργώντας ένα χάσμα στο θυγατρικό κλώνο. Ένα

σύστημα επιδιόρθωσης με ανασυνδυασμό λειτουργεί λαμβάνοντας ένα αντίγραφο της απύσας αλληλουχίας από ένα φυσιολογικό ομόλογο μόριο. Το νέο αντίγραφο χρησιμοποιείται για να καλυφθεί το χάσμα, ενώ το φυσιολογικό μόριο, που το χορήγησε, το χάσμα που δημιουργείται αποκαθίσταται με σύνθεση DNA.

Ένα σημαντικό χαρακτηριστικό τόσο του ανασυνδυασμού όσο και της επιδιόρθωσης είναι η ανάγκη χειρισμού δίκλωνων ρήξεων. Αυτές αποτελούν την απαρχή για την πραγματοποίηση διασκελισμών κατά τον ομόλογο ανασυνδυασμό. Μπορούν επίσης να προκληθούν από προβλήματα κατά την αντιγραφή, οπότε είναι δυνατόν να κινητοποιήσουν τη δράση συστημάτων επιδιόρθωσης με ανασυνδυασμό. Όταν οι δίκλωνες ρήξεις προκαλούνται από περιβαλλοντικούς παράγοντες ή από βράχυνση των τελομερών, μπορεί να προκαλέσουν μεταλλάξεις. Ένα σύστημα που διαχειρίζεται τις δίκλωνες ρήξεις, χωρίς να βασίζεται στο ζευγάρωμα ομόλογων περιοχών είναι ο μηχανισμός επιδιόρθωσης που ονομάζεται «σύνδεση μη ομόλογων άκρων» (non-homologous end-joining- NHEJ) και πραγματοποιεί συνένωση λείων άκρων DNA. Το πρώτο βήμα της διαδικασίας είναι η αναγνώριση των κομμένων άκρων από ένα ετεροδιμερές που αποτελείται από τις πρωτεΐνες Ku70 και Ku80. οι παραπάνω πρωτεΐνες σχηματίζουν ένα ικρίωμα μέσω του οποίου συγκρατούνται τα άκρα κοντά το ένα στο άλλο, γεγονός που επιτρέπει σε άλλα ένζυμα να δράσουν πάνω τους. Η σύνδεση των δίκλωνων άκρων πραγματοποιείται από την DNA λιγάση IV, η οποία λειτουργεί σε συνδυασμό με την πρωτεΐνη XRCC4. μεταλλάξεις σε οποιοδήποτε από αυτά τα ένζυμα μπορούν να κάνουν τα ευκαρυωτικά κύτταρα πιο ευαίσθητα σε γενοτοξικούς παράγοντες.

Οι ενζυμικές ενεργότητες που σχετίζονται με αυτά τα συστήματα είναι ενδονουκλεάσες και εξωνουκλεάσες (σημαντικές για την απομάκρυνση τμημάτων DNA με βλάβη), ρεσολβάσες (ενδονουκλεάσες που δρουν ειδικά στα σημεία ανασυνδυασμού), ελικάσες (που καταλύουν την αποπερίελιξη του DNA), αλλά και DNA πολυμεράσες (που συνθέτουν νέο DNA). Μερικές από αυτές τις ενζυμικές ενεργότητες είναι ειδικές για συγκεκριμένα μονοπάτια επιδιόρθωσης, κάποιες άλλες όμως συμμετέχουν σε πολλά διαφορετικά μονοπάτια.

Μερικά από τα συστήματα επιδιόρθωσης είναι λιγότερο ακριβή όταν συνθέτουν DNA για να αντικαταστήσουν υλικό που έχει υποστεί βλάβη. Γι' αυτό το λόγο, τα συστήματα αυτά αποκαλούνται αναξιόπιστα (error-prone).

Όταν τα συστήματα επιδιόρθωσης είναι ανενεργά, τα κύτταρα γίνονται εξαιρετικά ευαίσθητα στους γενοτοξικούς παράγοντες και στην υπεριώδη ακτινοβολία. Η επαγωγή βλαβών μέσω ακτινοβολίας UV έπαιξε πρωταρχικό ρόλο στη μελέτη των συστημάτων επιδιόρθωσης. Όταν όμως επιχειρούμε να αποτιμήσουμε τη δράση και την αποτελεσματικότητα ενός συστήματος επιδιόρθωσης πάνω σε βλάβες που έχουν προκληθεί από διαφορετικούς παράγοντες, θα πρέπει πάντα να λαμβάνουμε υπόψη μας ότι ίσως τα συμπεράσματά μας να μην ισχύουν για όλες τις περιπτώσεις βλαβών αλλά κάθε περίπτωση είναι ξεχωριστή (Lewin, 2004).

Σκοπός του παρόντος σταδίου της επιδιόρθωσης, που πραγματοποιήθηκε *ex vivo*, ήταν η αναγνώριση της βλάβης του DNA των κυττάρων, που δεν εντοπίστηκε κατά το στάδιο της *in vivo* εφαρμογής της ανάλυσης κομητών από τα ένζυμα επιδιόρθωσης, καθώς και η εκτίμηση της επίδρασης των γενοτοξικών παραγόντων στην αναστολή, ενεργοποίηση και

ενίσχυση των μηχανισμών επιδιόρθωσης των ηπατοκυττάρων κατά την *in vivo* έκθεσή τους.

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον έχουν εκείνα τα ένζυμα που συμμετέχουν στο μηχανισμό επιδιόρθωσης εκτομής νουκλεοτιδίων και εκτομής βάσεων, τα οποία αφαιρούν και αναπληρώνουν τα τμήματα του μορίου DNA που έχουν υποστεί τη βλάβη εισάγοντας εγκοπές στον έναν κλώνο προκαλώντας κερματισμό. Αυτές οι εγκοπές είναι δυνατό ν' ανιχνευθούν αφού αύξηση του κερματισμένου DNA στην ουρά του κομήτη αντικατοπτρίζει τη δραστηριότητα των μηχανισμών επιδιόρθωσης.

Ειδικότερα, γενοτοξικοί παράγοντες όπως τα βαρέα μέταλλα ενδεχομένως να επηρεάζουν και τη δράση των μηχανισμών επιδιόρθωσης των κυττάρων εκτός από την άμεση ή έμμεση επίδραση που έχουν στο κερματισμό του μορίου του DNA, προκαλώντας συσσώρευση βλαβών στο DNA. Επιπλέον, η «ανάλυση κομητών», ανιχνεύει μόνο τις βλάβες που οδηγούν στον κερματισμό του DNA είτε απευθείας είτε μέσω των μηχανισμών επιδιόρθωσης και όχι αυτές που διατηρούν το μόριο ανέπαφο. Η φύση της βλάβης στο μόριο του DNA παίζει επίσης σημαντικό ρόλο. Βλάβες που οφείλονται μόνο σε διάρρηξη του ενός κλώνου του DNA χωρίς να επηρεάζεται το ζευγάρωμα των βάσεων, επιδιορθώνονται άμεσα με τη δράση της λιγάσης, με αποτέλεσμα οι πυρήνες μετά την επιδιόρθωση να μην εμφανίζουν ουρά. Αντίθετα, βλάβες που έχουν ως αποτέλεσμα το σχηματισμό κυκλοβουτυλικών δακτυλίων, όπως π.χ. σχηματισμός διμερών θυμίνης-θυμίνης ή βλάβες που ενεργοποιούν τους μηχανισμούς επιδιόρθωσης εκτομής ή τους ειδικούς μηχανισμούς επιδιόρθωσης με εκτομή βάσεων, οδηγούν στην αφαίρεση

τμημάτων DNA με αποτέλεσμα να παρατηρείται αύξηση στο ποσοστό του κερματισμένου DNA.

Στην παρούσα εργασία εξετάστηκε η συμμετοχή των μηχανισμών επιδιόρθωσης στη βλάβη του DNA και η επίδραση που αυτοί έχουν στον κερματισμό του, καθώς και ο εντοπισμός βλαβών οι οποίες δεν ανιχνεύθηκαν *in vivo* κατά το πρώτο στάδιο της εργασίας. Έτσι ηπατοκύτταρα ατόμων τσιπούρας απομονώθηκαν και επωάστηκαν σε υγρή καλλιέργεια που περιείχε ως θρεπτικό υλικό Leibovitz L-15. Συγκεκριμένα, μέρος των ηπατοκυττάρων που απομονώθηκαν όπως αναφέρθηκε στην παράγραφο 2.3.1, επωάστηκαν σε υγρή καλλιέργεια, χωρίς την προσθήκη χαλκού ή ψευδαργύρου, που περιείχε για θρεπτικό υλικό Leibovitz L-15, 10% βόειο ορό (Fetal Calf Serum, FCS) και 1% αντιβιοτικά πενικιλίνη/στρεπτομυκίνη. Τα κύτταρα διατηρήθηκαν στην υγρή καλλιέργεια σε θερμοκρασία δωματίου (22°C) για χρονικό διάστημα δύο (2) ωρών (Lawrence *et al.*, 1991). Υπενθυμίζεται ότι όλη η διαδικασία της ανάλυσης κομητών, από τη λήψη του ιστού μέχρι το στάδιο της ηλεκτροφόρησης, επιτελείται σε θερμοκρασία μικρότερη των 4°C, ώστε να παρεμποδιστεί όσο το δυνατόν περισσότερο η λειτουργία των μηχανισμών επιδιόρθωσης (Henderson *et al.*, 1998).

2.6 Στατιστική ανάλυση

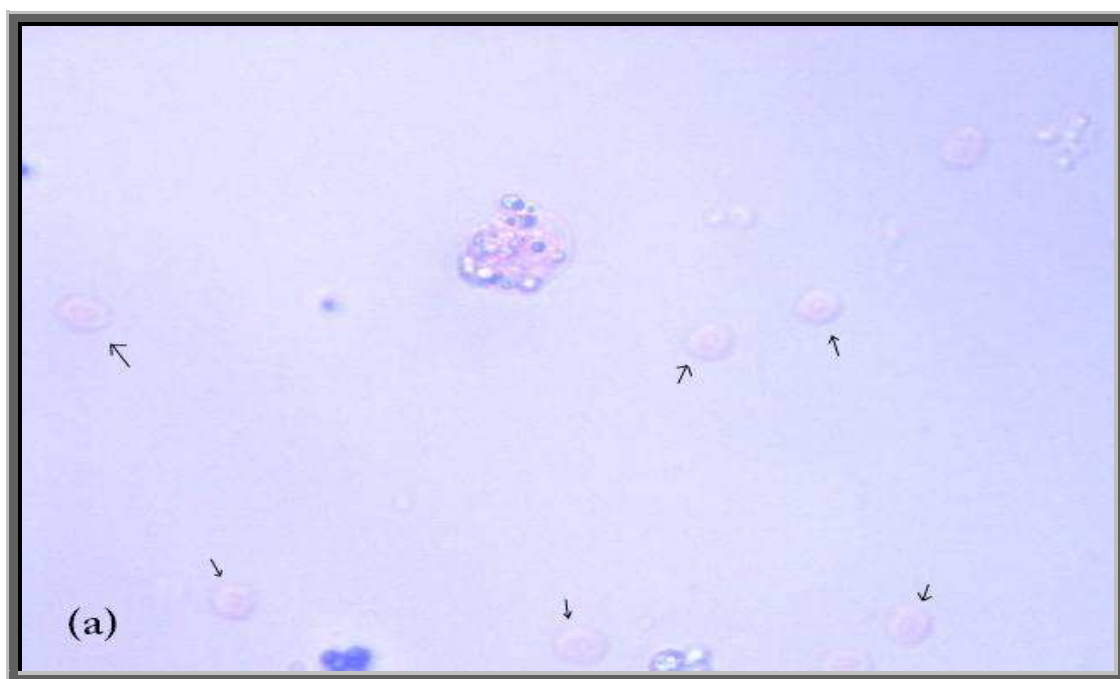
Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με έλεγχο Kruskal – Wallis επειδή δεν πληρούνταν οι προϋποθέσεις για την εφαρμογή της ανάλυσης διακύμανσης (ANOVA) (λόγω ανομοιογένειας διακυμάνσεων), σε στατιστικό πακέτο SPSS for Windows και Microsoft Excel. Το επίπεδο σημαντικότητας

ορίστηκε $\alpha=0,05$. Για τις πολλαπλές συγκρίσεις μεταξύ των ομάδων χρησιμοποιήθηκε μη παραμετρικό Tukey test (Zar, 1996).

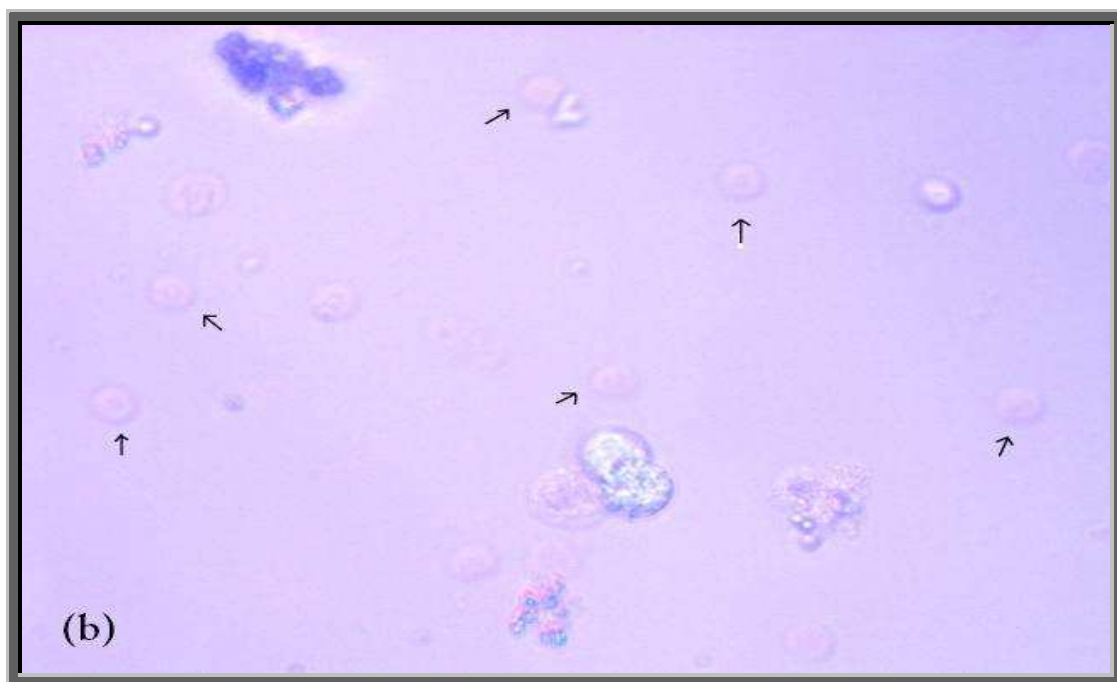
3. Αποτελέσματα

3.1 Απομόνωση ηπατοκυττάρων

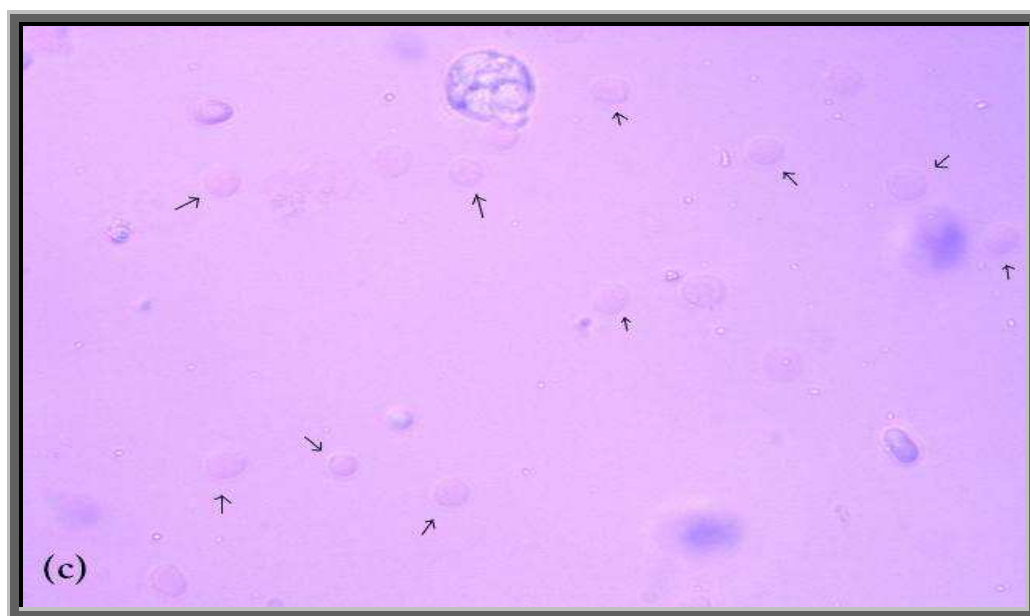
Οι εικόνες (8α, 8β, 8γ) και (9) παρουσιάζουν κύτταρα τα οποία έχουν απομονωθεί από το ήπαρ ατόμων τσιπούρας. Έχει γίνει χρώση με ηωσίνη για τον εντοπισμό ζώντων κυττάρων. Τα κύτταρα τοποθετήθηκαν σε αντικειμενοφόρο πλάκα Neubauer (δεν δείχνεται στις εικόνες) για να υπολογιστεί το ποσοστό των ζώντων κυττάρων που έχουν παραμείνει κατά τη δειγματοληψία. Υψηλό ποσοστό θνησιμότητας οδηγεί σε σφάλμα της εκτίμησης της βλάβης στο DNA. Τα ζώντα κύτταρα φαίνονται με ερυθρό χρώμα:



Εικόνα 8 (α) Τα ζώντα κύτταρα μόλις έχουν αρχίσει να χρωματίζονται και διακρίνεται η κυτταρική μεμβράνη και ο πυρήνας τους.



Εικόνα 8 (β): Ζώντα κύτταρα τα οποία έχουν αρχίσει να χρωματίζονται
ερυθρά λίγα λεπτά μετά την προσθήκη της ηωσίνης



Εικόνα 8 (γ) Ζώντα κύτταρα τα οποία έχουν χρωματιστεί εξολοκλήρου
ερυθρά.

Εναλλακτικά αντί για ηωσίνη χρησιμοποιείται η χρώση με Trypan blue για τον υπολογισμό των νεκρών κυττάρων (Εικόνα 9).

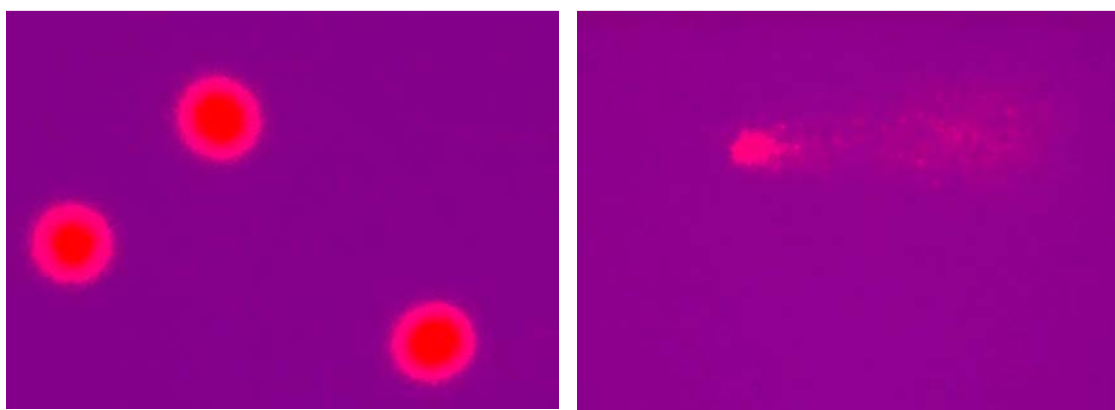


Εικόνα 9. Κύτταρο το οποίο έχει χρωματιστεί με τη προσθήκη του «Trypan Blue». Η χρωστική αυτή χρησιμοποιείται για τον εντοπισμό νεκρών κυττάρων (το αντίθετο ακριβώς από τη χρωστική ηωσίνη). Τα νεκρά κύτταρα χρωματίζονται μπλε.

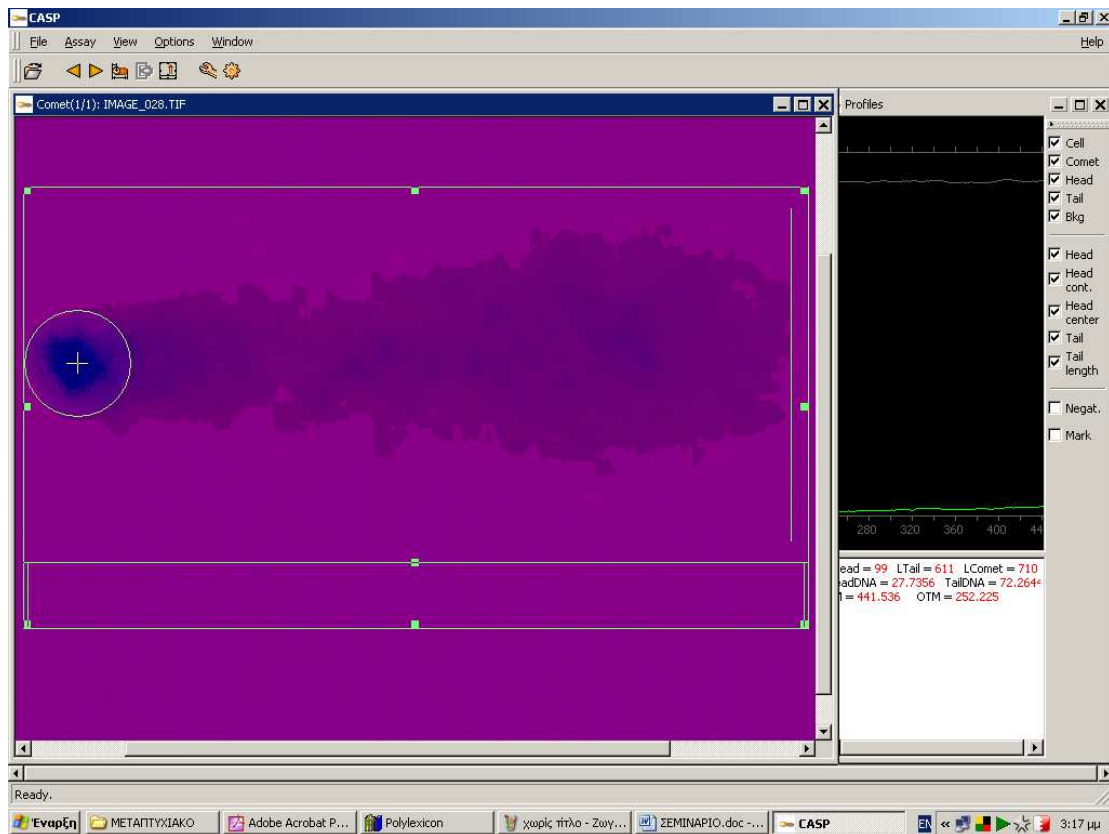
3.2 Εκτίμηση της βλάβης του DNA – Υπολογισμός της παραμέτρου TM

Όπως προαναφέρθηκε η έκταση της βλάβης του DNA εκτιμάται μετρώντας τη μετατόπιση ανάμεσα στον πυρήνα του κυττάρου ή «κεφαλή του κομήτη» και την «ουρά» η οποία προκύπτει λόγω κερματισμού του πυρηνικού DNA (Εικόνα 10). Μεταξύ των παραμέτρων που χρησιμοποιούνται είναι η

εκατοστιαία αναλογία του DNA στην ουρά, η εκατοστιαία αναλογία του DNA στον πυρήνα, το μήκος της ουράς, η διάμετρος του πυρήνα και το συνολικό μήκος του κομήτη (Εικόνα 11). Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε η παράμετρος TM – Tail Moment (το γινόμενο του μήκους της ουράς επί το ποσοστό του DNA στην ουρά του κομήτη).



Εικόνα 10. Ηπατοκύτταρα τσιπούρας (*S. aurata*) σε πήκτωμα αγαρόζης και αλκαλικό pH μετά από χρώση βρωμιούχου αιθιδίου (EtBr). Αριστερά, φαίνονται κύτταρα με ελάχιστο βαθμό κερματισμού, με αποτέλεσμα το DNA να παραμένει στον πυρήνα. Αντίθετα, στα δεξιά το κύτταρο έχει υποστεί εκτεταμένο κερματισμό, το DNA μεταναστεύει έξω από το κυτταρικό σώμα (κεφαλή του κομήτη) και μέσα στο πήκτωμα της αγαρόζης (ουρά του κομήτη).



Εικόνα 11. Υπολογισμός των παραμέτρων (εκατοστιαία αναλογία του DNA στην ουρά, εκατοστιαία αναλογία του DNA στον πυρήνα, το μήκος της ουράς, η διάμετρος του πυρήνα και το συνολικό μήκος του κομήτη) του κατακερματισμού του DNA, μέσω του λογισμικού ανάλυσης εικόνας “casp”.

3.3 Ανάλυση αποτελεσμάτων

Στους παρακάτω πίνακες (1α-1δ) δίνονται οι τιμές της TM στις διαφορετικές μεταχειρίσεις.

Πίνακας 1α: Σύγκριση του κερματισμένου DNA (μέσων τιμών TM) στα άτομα της μεταχείριση του χαλκού με το μάρτυρα (*in vivo*).

Μεταχειρίσεις	Αριθμός πυρήνων DNA (N)	Μέσος όρος TM & τυπικό σφάλμα, SE
Μάρτυρας	300	6,46 ± 1,42
Χαλκός 24 ώρες 0,1 ppm	299	22,52 ± 3,40
Χαλκός 24 ώρες 0,5 ppm	300	79,21 ± 7,24
Χαλκός 96 ώρες 0,1 ppm	300	29,98 ± 3,65
Χαλκός 96 ώρες 0,5 ppm	300	66,90 ± 6,28

Πίνακας 1β: Σύγκριση του κερματισμένου DNA (μέσων τιμών TM) στα άτομα της μεταχείριση του ψευδαργύρου με το μάρτυρα (*in vivo*).

Μεταχειρίσεις	Αριθμός πυρήνων DNA (N)	Μέσος όρος TM & τυπικό σφάλμα, SE
Μάρτυρας	300	6,46 ± 1,42
Ψευδ/ρος 24 ώρες 0,2 ppm	299	35,19 ± 3,24
Ψευδ/ρος 24 ώρες 1 ppm	271	67,33 ± 5,93
Ψευδ/ρος 96 ώρες 0,2 ppm	301	35,99 ± 5,50
Ψευδ/ρος 96 ώρες 1 ppm	300	57,66 ± 4,94

Πίνακας 1γ: Σύγκριση του κερματισμένου DNA (μέσων τιμών TM) στα άτομα της μεταχείριση του χαλκού με το μάρτυρα μετά την καλλιέργεια των κυττάρων (*ex vivo*).

Μεταχειρίσεις	Αριθμός πυρήνων DNA (N)	Μέσος όρος TM & τυπικό σφάλμα, SE
Μάρτυρας	300	51,43 ± 8,16
Χαλκός 24 ώρες 0,1 ppm	299	222,97 ± 15,68
Χαλκός 24 ώρες 0,5 ppm	299	256,94 ± 15,67
Χαλκός 96 ώρες 0,1 ppm	300	77,81 ± 9,13
Χαλκός 96 ώρες 0,5 ppm	300	230,97 ± 15,90

Πίνακας 1δ: Σύγκριση του κερματισμένου DNA (μέσων τιμών TM) στα άτομα της μεταχείριση του ψευδαργύρου με το μάρτυρα μετά την καλλιέργεια των κυττάρων (*ex vivo*).

Μεταχειρίσεις	Αριθμός πυρήνων DNA (N)	Μέσος όρος TM & τυπικό σφάλμα, SE
Μάρτυρας	300	51,43 ± 8,16
Ψευδ/ρος 24 ώρες 0,2 ppm	300	348,34 ± 15,68
Ψευδ/ρος 24 ώρες 1 ppm	300	287,74 ± 13,77
Ψευδ/ρος 96 ώρες 0,2 ppm	301	425,65 ± 13,41
Ψευδ/ρος 96 ώρες 1 ppm	300	324,55 ± 12,25

Η σημαντικότητα των διαφορών που παρατηρήθηκαν μεταξύ των διαφορετικών μεταχειρίσεων, συνοψίζονται στους παρακάτω πίνακες (2α-δ).

Πίνακας 2α. Πολλαπλές συγκρίσεις του κερματισμένου DNA (μέσων τιμών TM) στα άτομα της μεταχείριση του χαλκού, *in vivo*.

Πολλαπλές συγκρίσεις		SE	P
ΜΑΡΤΥΡΑΣ	0,1ppm Cu 24h	35,37	P<0,05*
	0,5ppm Cu 24h	35,34	P<0,05*
	0,1ppm Cu 96h	35,34	P<0,05*
	0,5ppm Cu 96h	35,34	P<0,05*
Χαλκός 0,1 ppm 24 ώρες	0,5ppm Cu 24h	35,37	P<0,05*
	0,1ppm Cu 96h	35,37	n.s.
	0,5ppm Cu 96h	35,37	P<0,05*
Χαλκός 0,5 ppm 24 ώρες	0,1ppm Cu 96h	35,34	P<0,05*
	0,5ppm Cu 96h	35,34	n.s.
Χαλκός 0,1 ppm 96 ώρες	0,5ppm Cu 96h	35,34	P<0,05*

* Στατιστικώς σημαντικές διαφορές

n.s.: Μη στατιστικώς σημαντικές διαφορές

Στον πίνακα 2α, φαίνεται πως τα άτομα όλων των μεταχειρίσεων του χαλκού διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά με τα άτομα του μάρτυρα. Επιπλέον στατιστικώς σημαντική διαφορά παρατηρείται και μεταξύ των ατόμων που εκτέθηκαν σε διαφορετικές συγκεντρώσεις ιόντων μετάλλου για το ίδιο χρονικό διάστημα (δοσοεξαρτώμενο αποτέλεσμα). Αντιθέτως, δεν παρατηρήθηκε στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ των ατόμων που εκτέθηκαν στην ίδια συγκέντρωση του μετάλλου αλλά για διαφορετικό χρονικό διάστημα, οδηγώντας στο συμπέρασμα πως το ποσοστό κερματισμένου DNA δεν

εξαρτάται από το χρόνο έκθεσης αλλά μόνο από τη μεταβολή στη συγκέντρωση.

Πίνακας 2β. Πολλαπλές συγκρίσεις του κερματισμένου DNA (μέσων τιμών TM) στα άτομα της μεταχείριση του ψευδαργύρου, *in vivo*.

Πολλαπλές συγκρίσεις		SE	P
ΜΑΡΤΥΡΑΣ	0,2 ppm Zn 24h	34,71	P<0,05*
	1,0 ppm Zn 24h	34,68	P<0,05*
	0,2ppm Zn 96h	34,68	P<0,05*
	1,0 ppm Zn 96h	34,68	P<0,05*
Ψευδάργυρος 0,2 ppm 24 ώρες	1,0 ppm Zn 24h	34,71	n.s.
	0,2ppm Zn 96h	34,71	P<0,05*
	1,0 ppm Zn 96h	34,71	n.s.
Ψευδάργυρος 1,0 ppm 24 ώρες	0,2ppm Zn 96h	34,68	P<0,05*
	1,0 ppm Zn 96h	34,68	n.s.
Ψευδάργυρος 0,2 ppm 96 ώρες	1,0 ppm Zn 96h	34,68	P<0,05*

* Στατιστικώς σημαντικές διαφορές

n.s.: Μη στατιστικώς σημαντικές διαφορές

Στον πίνακα 2β όπως και στον πίνακα 2α, φαίνεται πως όλα τα άτομα των μεταχειρίσεων του ψευδαργύρου διαφέρουν στατιστικώς από τα άτομα του μάρτυρα. Αντιθέτως δεν παρατηρούνται διαφορές μεταξύ των ατόμων που εκτέθηκαν σε συγκέντρωση μετάλλου 0,2 ppm για 24 ώρες και των ατόμων που εκτέθηκαν σε μεγαλύτερη συγκέντρωση (1,0 ppm) για 24 και 96 ώρες. Όπως στο χαλκό και όπως προκύπτει και από τα σχήματα 4 και 5, η

μεταβολή του ποσοστού του κερματισμένου DNA φαίνεται να παραμένει παρόμοια και κατά την έκθεση των ατόμων σε ιόντα ψευδαργύρου. Χαλκός και ψευδάργυρος φαίνεται να παρουσιάζουν παρόμοια γενεοτοξική δράση (*in vivo*).

Πίνακας 2γ. Πολλαπλές συγκρίσεις του κερματισμένου DNA (μέσων τιμών TM) στα άτομα της μεταχείριση του χαλκού μετά την καλλιέργεια των κυττάρων, *ex vivo*.

Πολλαπλές συγκρίσεις		SE	P
ΜΑΡΤΥΡΑΣ	0,1ppm Cu 24h	35,35	P<0,05*
	0,5ppm Cu 24h	35,35	P<0,05*
	0,1ppm Cu 96h	35,32	n.s.
	0,5ppm Cu 96h	35,32	P<0,05*
Χαλκός 0,1 ppm 24 ώρες	0,5ppm Cu 24h	35,38	n.s.
	0,1ppm Cu 96h	35,35	P<0,05*
	0,5ppm Cu 96h	35,35	n.s.
Χαλκός 0,5 ppm 24 ώρες	0,1ppm Cu 96h	35,35	P<0,05*
	0,5ppm Cu 96h	35,35	P<0,05*
Χαλκός 0,1 ppm 96 ώρες	0,5ppm Cu 96h	35,32	P<0,05*

* Στατιστικώς σημαντικές διαφορές

n.s.: Μη στατιστικώς σημαντικές διαφορές

Στον παραπάνω πίνακα (2γ), μη στατιστικώς σημαντικές διαφορές παρατηρήθηκαν:

i) μεταξύ των ατόμων του μάρτυρα και των ατόμων που εκτέθηκαν σε χαμηλή συγκέντρωση του μετάλλου (0,1 ppm) για 96 ώρες, εμφανίζοντας παρόμοιο ποσοστό κερματισμένου DNA,

ii) μεταξύ ατόμων που εκτέθηκαν σε χαμηλή συγκέντρωση μετάλλου (0,1 ppm) για 24 ώρες και ατόμων σε υψηλή συγκέντρωση (0,5 ppm) για 24 και 96 ώρες. Ειδικότερα τα αποτελέσματα ήταν οριακά για τα άτομα που εκτέθηκαν για 24 ώρες σε 0,5ppm.

Πίνακας 2δ. Πολλαπλές συγκρίσεις του κερματισμένου DNA (μέσων τιμών TM) στα άτομα της μεταχείριση του ψευδαργύρου μετά την καλλιέργεια των κυττάρων, *ex vivo*.

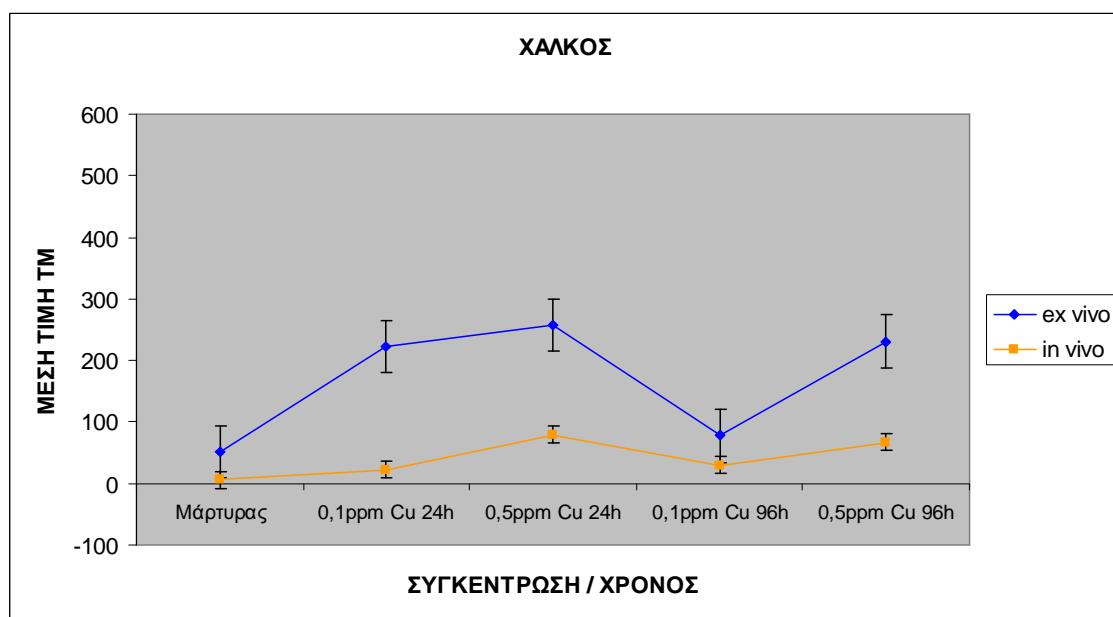
Πολλαπλές συγκρίσεις		SE	P
ΜΑΡΤΥΡΑΣ	0,2ppm Zn 24h	35,39	P<0,05*
	1,0ppm Zn 24h	35,39	P<0,05*
	0,2ppm Zn 96h	35,36	P<0,05*
	1,0ppm Zn 96h	35,39	P<0,05*
Ψευδάργυρος 0,2 ppm 24 ώρες	1,0ppm Zn 24h	35,39	P<0,05*
	0,2ppm Zn 96h	35,36	P<0,05*
	1,0ppm Zn 96h	35,39	n.s.
Ψευδάργυρος 1,0 ppm 24 ώρες	0,2ppm Zn 96h	35,36	P<0,05*
	1,0ppm Zn 96h	35,39	P<0,05*
Ψευδάργυρος 0,2 ppm 96 ώρες	1,0ppm Zn 96h	35,36	P<0,05*

* Στατιστικώς σημαντικές διαφορές

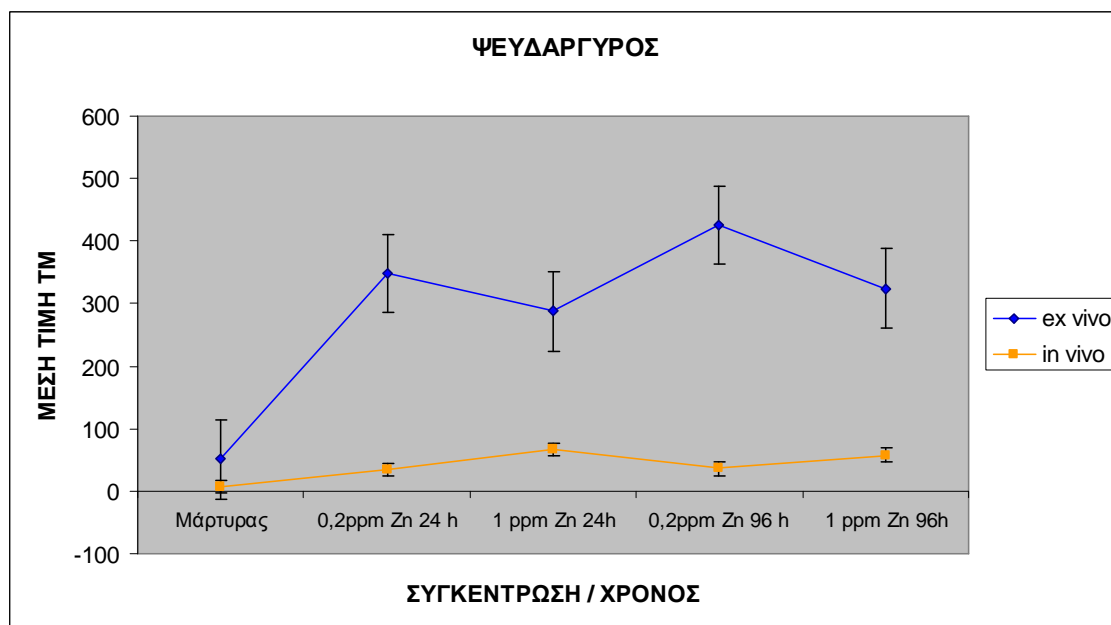
n.s.: Μη στατιστικώς σημαντικές διαφορές

Στον πίνακα 2δ, είναι φανερό ότι τα ποσοστά κερματισμένου DNA διαφέρουν σημαντικά μεταξύ των διαφορετικών μεταχειρίσεων, εκτός από την περίπτωση των ατόμων που εκτέθηκαν σε συγκέντρωση 0,2 ppm για 24 ώρες και των ατόμων που εκτέθηκαν σε συγκέντρωση μετάλλου 1,0 ppm για 96 ώρες, όπου και εμφάνισαν παρόμοιο ποσοστό κερματισμένου DNA.

Τα σχήματα 4 και 5 αναπαριστούν γραφικά τις μεταβολές της τιμής TM σε συνάρτηση με το χρόνο και τη συγκέντρωση κατά την έκθεσή των ατόμων σε ιόντα χαλκού και ψευδαργύρου. Οι μεταβολές TM *in vivo*, είτε πρόκειται για το χαλκό είτε για το ψευδάργυρο σχηματίζουν παρόμοιο διάγραμμα ενώ *ex vivo*, παρατηρείται αντίθετη εικόνα μεταξύ των δύο μετάλλων.



Σχήμα 4. Μεταβολή του ποσοστού του κερματισμένου DNA (μέση τιμή TM) σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση (0,1 και 0,5 ppm) και το χρόνο (24 και 96 ώρες) έκθεσης σε ιόντα χαλκού. Με μπλε και κίτρινη γραμμή παρουσιάζονται οι μεταβολές TM *ex vivo* και *in vivo* αντίστοιχα.



Σχήμα 5. Μεταβολή του ποσοστού του κερματισμένου DNA (μέση τιμή TM) σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση (0,2 και 1,0 ppm) και το χρόνο (24 και 96 ώρες) έκθεσης σε ιόντα ψευδαργύρου. Με μπλε και κίτρινη γραμμή παρουσιάζονται οι μεταβολές TM *ex vivo* και *in vivo* αντίστοιχα.

Από τους πίνακες 1α-1δ, 2α -2δ και τα σχήματα 4 και 5 συνοψίζονται τα αποτελέσματα της εργασίας αναφορικά με την επίδραση του χαλκού και του ψευδαργύρου:

Χαλκός: Από τους πίνακες 1α και 2α προκύπτει αύξηση του ποσοστού του κερματισμένου DNA όσο αυξάνεται η έκθεση των ατόμων σε υψηλότερες συγκεντρώσεις του μετάλλου (δοσοεξαρτώμενο αποτέλεσμα), εφόσον οι διαφορές που παρατηρούνται στις τιμές TM μεταξύ ατόμων που εκτέθηκαν σε διαφορετικές συγκεντρώσεις χαλκού, 0,1 και 0,5 ppm (22,52 και 79,21 για τις 24 ώρες και 29,98 και 66,90 για τις 96 ώρες αντίστοιχα), είναι στατιστικώς σημαντικές. Αντίθετα ο χρόνος έκθεσης των ατόμων στο χαλκό δε φαίνεται

επηρεάζει το ποσοστό κερματισμένου DNA εφόσον δεν παρατηρείται στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ των ατόμων που εκτέθηκαν στην ίδια συγκέντρωση για χρονικό διάστημα 24ωρ και 96 ωρών.

Όπως προκύπτει από τους πίνακες 1γ και 2γ, και αφορά το ποσοστό του κερματισμένου DNA που παρατηρείται στα ηπατοκύτταρα της καλλιέργειας (*ex vivo*), η εικόνα φαίνεται εν μέρει να διαφοροποιείται. Ειδικότερα, το ποσοστό του κερματισμένου DNA δεν παρουσιάζει στατιστικώς σημαντικές διαφορές μεταξύ των ατόμων με έκθεση στη χαμηλή συγκέντρωση (0,1 ppm) για 24 ώρες και αυτών με έκθεση στην υψηλότερη συγκέντρωση (0,5 ppm) για 96 ώρες, αλλά επιβεβαιώνεται το συμπέρασμα ότι ο χαλκός έχει άμεση δόσοεξαρτώμενη δράση τόσο τις πρώτες 24 όσο και στις 96 ώρες, ενώ εμφανίζει τις μέγιστες τιμές TM τόσο *in vivo* όσο και *ex vivo* (79,21 και 256,99 αντίστοιχα στη συγκέντρωση των 0,5 ppm) στο χρονικό διάστημα των 24 ωρών. Επιπλέον, υπάρχουν ισχυρές ενδείξεις ότι η ενεργοποίηση των μηχανισμών επιδιόρθωσης του DNA είναι δόσοεξαρτώμενη. Πιθανώς η έκθεση στη μεγαλύτερη συγκέντρωση (0,5 ppm) για χρονικό διάστημα 96 ωρών, να ενεργοποιεί και τους μηχανισμούς μεταβολισμού και αποβολής του μετάλλου από τα ηπατοκύτταρα, μειώνοντας τη γενετοξική του δράση, αφού τόσο *in vivo* όσο και *ex vivo* παρατηρείται ελαφρά κάμψη στις τιμές TM. Η υπόθεση αυτή ενισχύεται και από το γεγονός ότι *ex vivo*, τα άτομα που εκτέθηκαν στη μικρότερη συγκέντρωση (0,1 ppm) για 96 ώρες εμφάνισαν παρόμοιο ποσοστό κερματισμένου DNA με τα άτομα του μάρτυρα, ενώ *in vivo* δε φαίνεται να προκαλείται αύξηση της βλάβης του DNA μεταξύ των ατόμων με έκθεση στις ίδιες συγκεντρώσεις για 24 και 96 ώρες (η βλάβη στο μόριο του DNA που προκαλείται από το χαλκό δεν είναι χρονοεξαρτώμενη).

Γενικά, η εικόνα της μεταβολής των τιμών TM σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση και το χρόνο φαίνεται να διατηρείται τόσο *in vivo* όσο και *ex vivo*. Η γενοτοξικότητα του χαλκού φαίνεται να είναι δόσοεξαρτώμενη αλλά όχι χρονοεξαρτώμενη γεγονός που συνηγορεί στην ενεργοποίηση μηχανισμών αποβολής του μετάλλου από τα ηπατοκύτταρα. Επιπλέον, στα κύτταρα της υγρής καλλιέργειας, η παράμετρος TM φαίνεται να λαμβάνει υψηλότερες τιμές, που οδηγεί στο συμπέρασμα της αυξημένης δράσης των μηχανισμών επιδιόρθωσης των κυττάρων και ίσως στην αύξηση της ευαισθησία της τεχνικής της ανάλυσης κομητών για την ανίχνευση βλάβης στο μόριο του DNA.

Ψευδαργύρος: Από τους πίνακες 1β και 2β συνάγεται το συμπέρασμα ότι το μεγαλύτερο ποσοστό κερματισμένου DNA (TM=67,33) παρατηρείται όταν τα άτομα τσιπούρας εκτίθενται σε υψηλές συγκεντρώσεις ψευδαργύρου (1,0 ppm) και σε σύντομο χρονικό διάστημα (24 ώρες). Επιπλέον το ποσοστό του κερματισμένου DNA που προκαλείται από την έκθεση σε υψηλές συγκεντρώσεις του μετάλλου (1,0 ppm), φαίνεται να μην επηρεάζεται από το χρόνο έκθεσης για 24 ή 96 ώρες (TM= 67,33 και 57,66 αντίστοιχα) αφού οι διαφορές που εμφανίζουν δεν είναι στατιστικώς σημαντικές. Αντίθετα η έκθεση των ατόμων σε χαμηλές συγκεντρώσεις ψευδαργύρου (0,2 ppm), αυξάνει στατιστικώς σημαντικά το ποσοστό του κερματισμένου DNA σε σχέση με το χρόνο έκθεσης από 35,19 σε 35,99 για 24 και 96 ώρες αντίστοιχα. Για χρονικό διάστημα 24ων ωρών από την έκθεση των ιχθύων σε ιόντα ψευδαργύρου, η αύξηση της συγκέντρωσης από 0,2 ppm σε 1,0 ppm δεν προκαλεί στατιστικώς σημαντική μεταβολή στις τιμές TM (35,19 και 67,33 αντίστοιχα). Ενώ αντίθετα για χρόνο έκθεσης 96 ωρών, αντίστοιχη αύξηση της

συγκέντρωσης οδηγεί σε στατιστικώς σημαντική αύξηση του ποσοστού του κερματισμένου DNA ($TM=35,99$ και $57,66$ αντίστοιχα).

Αντίστοιχα, όπως προκύπτει από τους πίνακες 1δ και 2δ που αναφέρονται στα κύτταρα της καλλιέργειας, έκθεση των ιχθύων σε χαμηλή συγκέντρωση ψευδαργύρου ($0,2$ ppm), αυξάνει στατιστικώς σημαντικά το ποσοστό κερματισμού του DNA σε συνάρτηση με το χρόνο έκθεσης για 24 και 96 ώρες ($TM= 348,34$ και $456,65$ αντίστοιχα) και βρίσκονται σε αντιστοιχία με τα δεδομένα των πινάκων 1β και 2β όπως αναφέρθηκε στην προηγούμενη παράγραφο. Παρόμοια μεταβολή παρατηρείται και για την έκθεση των ιχθύων σε υψηλή συγκέντρωση ιόντων μετάλλου ($1,0$ ppm) όπου η παράμετρος TM αυξάνει από $287,74$ σε $324,55$ για 24 και 96 ώρες αντίστοιχα (*in vivo* παρατηρήθηκε μη στατιστικώς σημαντική μείωση της τιμής της παραμέτρου TM από $67,33$ σε $57,66$ για χρόνο έκθεσης 24 και 96 ώρες αντίστοιχα). Εντύπωση προκαλεί η στατιστικώς σημαντική μείωση των τιμών TM σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση για έκθεση στις 24 και 96 ώρες.

Γενικά, η εικόνα της γενοτοξικότητας του ψευδαργύρου *in vivo*, δείχνει να είναι χρονοεξαρτώμενη για έκθεση σε χαμηλή συγκέντρωση και δοσοεξαρτώμενη στις 96 ώρες. Αντίστοιχα *ex vivo*, η γενοτοξικότητα είναι χρονοεξαρτώμενη και σε χαμηλές και σε υψηλές συγκεντρώσεις, ενώ εμφανίζει αρνητική δοσοεξαρτώμενη συμπεριφορά και για τα δύο χρονικά διαστήματα (24 και 96 ώρες). Αυτό ίσως εξηγείται από τη διαφορετική επίδραση που έχει ο ψευδάργυρος στους μηχανισμούς επιδιόρθωσης του DNA, όπου η έκθεση σε χαμηλή συγκέντρωση φαίνεται να τους ενεργοποιεί ενώ σε υψηλή συγκέντρωση να τους αναστέλλει. Όπως στο χαλκό έτσι και στο ψευδάργυρο, τα κύτταρα της υγρής καλλιέργειας, εμφανίζουν την

παράμετρο TM να λαμβάνει υψηλότερες τιμές. Αυτό οδηγεί στο συμπέρασμα της αυξημένης δράσης των μηχανισμών επιδιόρθωσης των κυττάρων και ίσως στην αύξηση της ευαισθησία της τεχνικής της «ανάλυσης κομητών» στην ανίχνευση βλάβης στο μόριο του DNA.

4. Συζήτηση

4.1 Βαρέα μέταλλα

Στο περιβάλλον έχουν ανιχνευθεί άνω των 40 στοιχεία που ανήκουν στην κατηγορία των μετάλλων. Ορισμένα από αυτά είναι χρήσιμα για την ανάπτυξη των βιολογικών οργανισμών. Το ασβέστιο, το μαγνήσιο, ο σίδηρος, το κάλιο και το νάτριο είναι απαραίτητα για την διατήρηση της ζωής, αλλά σε αυξημένες συγκεντρώσεις καθίστανται τοξικά. Ιχνοστοιχεία όπως το χρώμιο, το κοβάλτιο, ο χαλκός, το μαγγάνιο, το νικέλιο, το σελήνιο και ο ψευδάργυρος αποτελούν το ενεργό κέντρο σημαντικών ενζύμων σε μεταβολικές διεργασίες (φωτοσύνθεση, αντιοξειδωτική δράση, κλπ). Άλλα μέταλλα όμως, όπως ο μόλυβδος, το κάδμιο και ο υδράργυρος είναι τοξικά στους βιολογικούς ιστούς σε οποιαδήποτε συγκέντρωση.

Η κυριότερη πηγή μετάλλων στο περιβάλλον είναι το έδαφος της γης όπου βρίσκονται όλα σχεδόν τα μέταλλα και τα οποία με διάφορους γεωχημικούς κύκλους και ανθρωπογενείς επεμβάσεις ανακατανέμονται στα διάφορα περιβαλλοντικά διαμερίσματα. Η βιομηχανική, τεχνολογική και γεωργική δραστηριότητα αποτελούν επίσης σημαντικούς παράγοντες ρύπανσης από μέταλλα, από την απόρριψη βιομηχανικών αποβλήτων, μεταλλευτικές εκμεταλλεύσεις, εμπλουτισμό και παραγωγή μεταλλικών αντικειμένων, χρήση λιπασμάτων, κλπ. Η καύση στερεών καυσίμων είναι μία άλλη πηγή εκπομπής μετάλλων στην ατμόσφαιρα που τελικά εναποτίθενται στο έδαφος και τα νερά.

Οι παράγοντες που επηρεάζουν την τοξικότητα των μετάλλων σε σχέση με τους βιολογικούς οργανισμούς είναι αρκετοί και αφορούν τις μεταβολικές διεργασίες, την απέκκριση, τη συμπλοκοποίηση και την εξουδετέρωση, καθώς και τους μηχανισμούς ελευθέρων ριζών που παίζουν καθοριστικό ρόλο στις βλάβες των βασικών βιομορίων. Η θερμοκρασία επηρεάζει το μεταβολισμό και την τοξικότητα των μετάλλων. Αύξηση της θερμοκρασίας αυξάνει την τοξικότητα μετάλλων σε υδρόβια ασπόνδυλα, αλλά τα αποτελέσματα διαφέρουν ανάλογα με το είδος του οργανισμού και του μετάλλου. Το φως είναι επίσης ένας άλλος παράγοντας, γιατί ορισμένα ένζυμα που επιδρούν κατασταλτικά στην τοξικότητα των μετάλλων επιδεικνύουν αυξομειώσεις μεταξύ των φάσεων φωτός-σκότους στους οργανισμούς. Η μεγαλύτερη δραστηριότητα του μικροσωμικού κυτοχρώματος P450, που είναι το κυριότερο ένζυμο που συμμετέχει σε μηχανισμούς καταστολής της τοξικότητας, ξεκινά στην σκοτεινή φάση του κύκλου των έμβιων όντων. Επίσης, το pH είναι σημαντικός αβιοτικός παράγοντας που προσδιορίζει σε μεγάλο βαθμό την πρόσληψη μετάλλων από τα φυτά σε σχέση με το έδαφος, επηρεάζει τη μετακίνηση των μεταλλικών αλάτων σε εδαφικά στρώματα και στα ιζήματα. Οι όξινες εναποθέσεις επιταχύνουν την τοξική δράση των μετάλλων στα νερά και ορισμένες φορές μετατρέπουν τα μέταλλα και ενώσεις τους σε περισσότερο τοξικές δομές. Η τοξικότητα των μετάλλων αυξάνεται, όπως είναι φυσικό με την αύξηση των συγκεντρώσεων στο περιβάλλον και στους βιολογικούς ιστούς, τα μίγματα μετάλλων παρουσιάζουν συνεργική δράση και ορισμένα μέταλλα μπορούν να εκτοπίσουν άλλα χρήσιμα μέταλλα για τη λειτουργία των οργανισμών. Τα

βαρέα μέταλλα παρουσιάζουν καρκινογόνο δράση μέσω οξειδωτικών μηχανισμών στο κυτταρικό DNA.

Στα υδάτινα συστήματα τα μέταλλα βρίσκονται υπό μορφή διαλυτών αλάτων ή αιωρουμένων σωματιδίων και με το χρόνο συγκεντρώνονται στα ιζήματα ποταμών, λιμνών και παράκτιων περιοχών. Ατμοσφαιρικές κατακρημνίσεις, γεωθερμικές διεργασίες, έκπλυση επιφανειακών εδαφών, διάβρωση εδαφών και διάσπαση ορυκτών εμπλουτίζουν στα νερά σε βαρέα μέταλλα και μεταλλοειδή. Σημαντικές συγκεντρώσεις μετάλλων έχουν μετρηθεί σε θαλάσσια, ποτάμια και λιμναία ιζήματα.

Οι κυριότερες δράσεις των μετάλλων είναι νεφροτοξικές (Pb, Hg, As, Cd), νευροτοξικές (ιδιαίτερα των οργανικών ενώσεων Hg, Pb, Sn) και καρκινογόνες (As, Cr, Ni). Η καρκινογόνος δράση των μετάλλων έχει μελετηθεί με μεγάλο αριθμό τοξικολογικών ερευνών και έχει βρεθεί ότι ο μηχανισμός της άμεσης προσθήκης σε κυτταρικό DNA (που προκαλεί μεταλλάξεις) είναι δευτερεύουσας σημασίας, σε σχέση με τη δράση μέσω οξειδωτικών βλαβών στο DNA που προκαλούνται από την παραγωγή ελευθέρων ριζών.

4.1.1 Ψευδάργυρος (Zn)

Ο ψευδάργυρος είναι ένα βασικό θρεπτικό ιχνοστοιχείο που απαντάται σε μικρές ποσότητες στα φυτά, στους μικροοργανισμούς και στα ζώα (Strydom *et al.*, 2006). Είναι επίσης γνωστό ότι σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις είναι τοξικός για τους υδρόβιους οργανισμούς (Rattner and Heath, 1995). Η πρόσληψη του στοιχείου γίνεται είτε μέσω των κυτταρικών

μεμβρανών με παθητική μεταφορά ή με ενδοκύτωση (Viarengo, 1985) είτε μέσω της τροφής (Heath, 1987).

Ο ψευδάργυρος είναι απαραίτητος συμπαραγοντας (cofactor) σε πολλά ένζυμα και επηρεάζει το μεταβολισμό των πρωτεϊνών και των υδατανθράκων (Somasundaram *et al.*, 1984). Είναι ζωτικής σημασίας διότι σχηματίζει το ενεργό κέντρο σε πολλά μεταλλοένζυμα (Martinez *et al.*, 1999) συμπεριλαμβανομένων των DNA και RNA πολυμερασών. Επιπλέον, ως ιόν ενώνεται με δομικά συστατικά της κυτταρικής μεμβράνης και βοηθά στην διατήρηση των δομών και λειτουργιών τους (Viarengo, 1985). Επίσης έχει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη των γονάδων των ιχθύων (Kotze *et al.*, 1999).

Έλλειψη ψευδαργύρου προκαλεί ανορεξία, αδυναμία απόκτησης βάρους, σκελετικές ανωμαλίες και κακώσεις του δέρματος (Strydom *et al.*, 2006), καθώς και μειωμένη αντιοξειδωτική απόκριση των οργανισμών.

Είναι συστατικό πολλών βιομηχανικών και ορυκτών αποβλήτων που απορρίπτονται στα υδάτινα συστήματα θέτοντας σε κίνδυνο τους υδρόβιους οργανισμούς. Τα υψηλά επίπεδα ψευδαργύρου οφείλονται επίσης σε ατμοσφαιρικές εναποθέσεις, στα οικιακά λύματα, στα ορυκτά, στα εντομοκτόνα και στην επιμετάλλωση.

Η τοξικότητα του ψευδαργύρου εξαρτάται από χημικούς παράγοντες του νερού που περιλαμβάνουν τη συγκέντρωση διαλυμένου οξυγόνου, τη σκληρότητα, το pH και τη θερμοκρασία (Nussey, 1998), όπως επίσης από την παρουσία άλλων βαρέων μετάλλων και των αλκαλικών γαιών. Η υψηλή θερμοκρασία οδηγεί σε αύξηση της τοξικότητας (Rattner and Heath, 1995), ενώ αύξηση της σκληρότητας του νερού, του pH, και η παρουσία οργανικών χηλικών παραγόντων οδηγεί σε μείωση (Strydom *et al.*, 2006). Επίσης,

χαμηλή περιεκτικότητα του διαλυμένου οξυγόνου στο νερό αυξάνει την τοξικότητα του ψευδαργύρου. Η δράση του μετάλλου εξαρτάται από τις διαφορετικές συγκεντρώσεις που απαντάται. Ο ψευδάργυρος έχει ανταγωνιστική και προστατευτική δράση έναντι άλλων μετάλλων π.χ. του καδμίου, σε ότι αφορά την πρόσληψη και την τοξικότητα (Kargin and Cogun, 1999).

4.1.1.1 Επίδραση του ψευδαργύρου στους ιχθύς

Οι ελάχιστες διαθέσιμες αναφορές για το ψευδάργυρο που αφορά την ανάπτυξη των ψαριών είναι αντικρουόμενες (Strydom *et al.*, 2006), δείχνοντας ότι η ανάπτυξη του *Oncorhynchus nerka* ενεργοποιείται ελαφρώς σε σχετικά υψηλές συγκεντρώσεις των 242 µg/L. Αντίθετα μείωση του ρυθμού αύξησης παρατηρήθηκε στο *Jordanella floridae* (Spehar, 1976), στο *Pimephales promelas* (Brungs, 1969) στα guppies (*Lebistes reticulatus*) (Crandal and Goodnight, 1962) και στο *Phoxinus phoxinus* (Bengtsson, 1974α).

Έχει αναφερθεί οξεία θνησιμότητα στους ιχθύς, που προκαλείται από έκθεση τους σε υψηλές συγκεντρώσεις ιόντων ψευδαργύρου όπως επίσης και οι χρόνιες συνέπιες τους σε χαμηλότερες από τη θανατηφόρο δόση συγκεντρώσεις (Crespo and Balasch, 1980: Strydom *et al.*, 2006). Η έκθεση σε υψηλές συγκεντρώσεις, προκαλούν παθολογικές και μορφολογικές ανωμαλίες στα ενήλικα ψάρια (Somasundaram *et al.*, 1984) καθώς επίσης και παρενέργειες στη φυσιολογία τους. Εντούτοις, ο τρόπος δράσης της τοξικότητας του ψευδαργύρου είναι αβέβαιος, υψηλές τοξικές συγκεντρώσεις είναι θανατηφόρες για τα ψάρια επειδή καταστρέφουν τον ιστό των βραγχίων

και επιπλέον προκαλούν εξασθένιση της εισροής ιόντων ασβεστίου στα βράγχια οδηγώντας σε υπασβεσταιμία (Hoogstrand *et al.*, 1994).

Ο Strydom *et al.*, 2006, αναφέρει ότι ο ψευδάργυρος συσσωρεύεται στα βράγχια, στο ήπαρ, και στους νεφρούς αλλά είναι απών ή βρίσκεται σε μικρές ποσότητες στο μυϊκό ιστό. Μετά από έκθεσή τους σε διαφορετικές συγκεντρώσεις $Zn(NO_3)_2$ σε γλυκό νερό, ο Bengtsson (1974β), παρατήρησε ότι τα ενήλικα ψάρια *Phoxinus phoxinus*, εμφάνισαν αιμορραγίες και κακώσεις. Βλάβες παρατηρήθηκαν επίσης στη σπονδυλική τους στήλη.

Οι Sehal και Saxena (1986), παρατήρησαν ότι ανεστάλη η δράση των γανάδων στα αρσενικά και στα θηλυκά άτομα του είδους *Lebistes reticulatus* που εκτέθηκαν σε μικρότερες της θανατηφόρου δόσεις. Έκθεση σε συγκέντρωση 300 $\mu g/L$ $ZnSO_4$ για χρονικό διάστημα 20 ημερών οδήγησε σε δραστικές αλλαγές στους όρχεις. Τα μέταλλα που συσσωρεύονται στα ενήλικα ψάρια ενδεχομένως μεταφέρονται στα ωάρια κατά την ωογένεση, με σοβαρές επιπτώσεις στην εμβρυϊκή ανάπτυξη.

Σύμφωνα με τον Holcombe *et al.* (1979), η έκθεση στο ψευδάργυρο οδηγεί στη δημιουργία ευθραύστων ωαρίων με αποτέλεσμα κατά τη διάρκεια της αναπαραγωγής να θραύονται εύκολα. Αντίστοιχα οι λάρβες των ψαριών εμφανίζουν ποικίλες δυσμορφίες σε διάφορα όργανα (Somasundaram *et al.*, 1984).

Στα επιφανειακά ύδατα των ωκεανών η συγκέντρωση του μετάλλου είναι της τάξης των 0,5 nmol/L (0,033 ppb) και πλησιάζει τα 2-10 nmol/L (0.125 – 0.650 ppb) στα βαθύτερα στρώματα (Landing *et al.*, 1995). Γενικότερα θεωρείται ότι η μέση φυσιολογική συγκέντρωση του μετάλλου στο θαλασσινό νερό κυμαίνεται από 0-0,1 ppm, ενώ στο Αιγαίο η παρατηρήθηκαν

συγκεντρώσεις από 0,13-8,3μg/L (0,13-8,3 ppb) (Scoulos *et al.*, 2005). Για την παρούσα εργασία, η ένωση που χρησιμοποιήθηκε ήταν ο χλωριούχος ψευδάργυρος (ZnCl₂) και οι συγκεντρώσεις 0,2 και 1 ppm, συγκρίσιμες με τα επίπεδα ρύπανσης σε επιβαρυμένες περιοχές με αστικά και βιομηχανικά λύματα και σε επίπεδα χαμηλότερα της μέσης θανατηφόρου δόσης για τις 96 ώρες (LD₅₀=3.79mg/L) (Bagdonas and Vosyliene, 2006).

4.1.2 Χαλκός

Ο χαλκός όπως ο ψευδάργυρος είναι βασικό θρεπτικό ιχνοστοιχείο για τα φυτά, τα ζώα και τον άνθρωπο. Στην ουσία είναι απαραίτητος για όλους τους ζωντανούς οργανισμούς. Αν και απαντάται σε μικρές ποσότητες, στη φύση, βρίσκεται στις κατάλληλες συγκεντρώσεις για την ανάπτυξη των υδάτινων οικοσυστημάτων (Steemann and Wium-Andersen, 1970).

Στα ζώα είναι απαραίτητος για το σχηματισμό των οστών, για τη σύνθεση της αιμοσφαιρίνης, είναι βασικό συστατικό των ορισμένων μεταλλοενζύμων, της οξειδάσης του κυττοχρώματος και άλλων ενζύμων που παίρνουν μέρος σε αντιδράσεις οξειδοαναγωγής στα κύτταρα (Sorensen, 1991: Dallas and Day 1993). Είναι απαραίτητος στο μεταβολισμό των κυττάρων, όπου η συγκέντρωσή του παραμένει σταθερή, αλλά γίνεται τοξικός σε υψηλές συγκεντρώσεις. Το ήπαρ στα θηλαστικά και στα ψάρια είναι σημαντικό όργανο αποθήκευσης για το χαλκό.

4.1.2.1 Αύξηση των επιπέδων χαλκού και παράγοντες που επηρεάζουν την τοξικότητά του

Αν και ο χαλκός παίζει σημαντικό ρόλο στις βιολογικές διεργασίες, εντούτοις είναι τοξικός σε συγκεντρώσεις υψηλότερες του φυσιολογικού ($<0,05\mu\text{mol/L}$) (Stouthart *et al.*, 1996). Ακόμα και σε φυσιολογικά επίπεδα συγκεντρώσεων, η ιοντική μορφή είναι τοξική σε συνδυασμό με τη φωτοσύνθεση και την ανάπτυξη των μονοκύτταρων φυκών (Steemann and Wium-Andersen, 1970).

Ο χαλκός είναι ένα από τα μέταλλα που χρησιμοποιεί περισσότερο ο πολιτισμός μας. Φτάνει στα υδάτινα οικοσυστήματα μέσω ανθρωπογενών δραστηριοτήτων όπως τη βιομηχανία, την εξόρυξη, την επιμετάλλωση, τη χρήση αλάτων του χαλκού για τον έλεγχο της υδάτινης χλωρίδας και τη χρήση λιπασμάτων.

Ο χαλκός, μία κοινή τοξική ουσία στο νερό, έχει σχεδόν άγνωστο τρόπο δράσης στους υδρόβιους οργανισμούς, και η τοξικότητά του οφείλεται κυρίως στα ιόντα Cu^{++} που σχηματίζουν συμπλέγματα με άλλα ιόντα (Nussey, 1998). Μεταβολή στην ποσότητα των ελεύθερων διαλυμένων ιόντων Cu^{++} επηρεάζει τη βιοδιαθεσιμότητα του και κατά συνέπεια τη τοξικότητά του (Welsh *et al.*, 1993). Μείωση στο νερό του διαλυμένου οξυγόνου, της σκληρότητας, της θερμοκρασίας, του pH, των χηλικών παραγόντων, αυξάνουν την τοξικότητα των ιόντων Cu^{++} . Οργανικές και ανόργανες ενώσεις συχνά σχηματίζουν σύμπλοκα με τα ιόντα του χαλκού σχηματίζοντας τη σωματιδιακή μορφή του μετάλλου που είναι και η συχνότερη. Αντίθετα τα ελεύθερα ιόντα απαντώνται κυρίως σε όξινο μαλακό νερό (EIFAC, 1978). Η

χημική μορφή του μετάλλου εξαρτάται από το pH του νερού. Ο χαλκός στο νερό καθιζάνει σε αλκαλικό περιβάλλον (υψηλό pH) και δεν είναι τοξικός, ενώ σε όξινο περιβάλλον (χαμηλό pH), έχει μεγάλη κινητικότητα, είναι ευδιάλυτος και αρκετά τοξικός (Nussey, 1998).

Η κύρια διαφορά μεταξύ θηλαστικών και ψαριών που αφορά την τοξικότητα του χαλκού, είναι ο τρόπος πρόσληψης του μετάλλου από το περιβάλλον. Στα ψάρια η πρόσληψη γίνεται σχεδόν αποκλειστικά από τα βράγχια όπου είναι επίσης και η έδρα των αρχικών αντισταθμιστικών ενεργειών του οργανισμού.

4.1.2.2 Επίδραση του χαλκού στους ιχθύς

Η τοξική επίδραση του χαλκού στα ψάρια περιλαμβάνει: αλλαγές στη βιοχημεία, ανατομία, φυσιολογία και συμπεριφορά. Σε κυτταρικό επίπεδο, ο χαλκός αναστέλλει τη λειτουργία της αντλίας ιόντων νατρίου/καλίου, προκαλεί υπεροξειδωση των λιπαρών οξέων, και διάφορες βλάβες στη μορφολογία του κυττάρου. Παρατηρήσεις σε άτομα πέστροφας που εκτέθηκαν επίσης σε ψευδάργυρο, έδειξαν βλάβες στη σπονδυλική στήλη, χωρίς να παρουσιάζουν ιστολογικές αλλοιώσεις (Bengtsson, 1974β). Βλάβη στα βράγχια των ψαριών, προκαλεί πιθανή συσσώρευση βλέννας και κατά συνέπεια αναπνευστικά προβλήματα που οδηγούν σε αύξηση του στρες και στο θάνατο (Lewis and Lewis, 1971). Επίσης προκαλεί μείωση του καρδιακού ρυθμού (βραδυκαρδία), αύξηση της ανταλλαγής αερίων στα βράγχια με πιθανό αποτέλεσμα την αναιμία, και τέλος, ενώ η κινητική δραστηριότητα αυξάνεται, τα αποθέματα γλυκογόνου στο ήπαρ μειώνονται (Heath, 1987).

Έκθεση στο χαλκό προκαλεί μείωση στην ανάπτυξη, ιδιαίτερα στην αρχή (Marr *et al.*, 1996), διαταραχές στην μεταφορά, ανταλλαγή και συγκέντρωση ιόντων στα βράγχια και στο πλάσμα, και επηρεάζει την ενζυμική δραστηριότητα στο αίμα και στο ήπαρ (Stagg and Shuttleworth, 1982). Ενδεχομένως σε αυτόν να οφείλεται η ανοσοκαταστολή, παραμορφώσεις της σπονδυλικής στήλης και νευρολογικές διαταραχές (Stouthart *et al.*, 1996).

Ο χαλκός αποδείχτηκε ότι επηρεάζει τη συνήθη κολυμβητική δραστηριότητα της πέστροφας. Μια πιθανή εξήγηση είναι ότι η κινητική δραστηριότητα του εκτεθειμένου σε χαλκό οργανισμού ελαττώνεται για λόγους εξοικονόμησης ενέργειας ώστε να καταστεί δυνατή η αποτοξίνωση του από τα ιόντα μετάλλου χωρίς να μειωθεί ο δείκτης μετατρεψιμότητας της τροφής και ο ρυθμός ανάπτυξης (Handy *et al.*, 1999).

Η έκθεση στο χαλκό του είδους *Pimephales notatus* επιδρά αρνητικά στην επιβίωση και στην ανάπτυξη του γόνου, καθώς και στην αναπαραγωγή (Horning and Neiheisel, 1979). Σε ότι αφορά το μέγεθος του σώματος, βρέθηκε να συσχετίζεται αρνητικά στις υψηλές συγκεντρώσεις ενώ παρατηρήθηκε αύξηση του μεγέθους σε μικρότερες συγκεντρώσεις. Ο χαλκός εμποδίζει τη φυλετική ωρίμανση των αρσενικών ατόμων σε συνδυασμό με μείωση του αριθμού των σπερματοζωαρίων. Στα θηλυκά άτομα, παρατηρήθηκε μείωση στην ανάπτυξη των ωαρίων όταν εκτέθηκαν σε συγκεντρώσεις 0,018-0,119 mg/L.

Ο Marr *et al.*, (1996), παρατήρησε σημαντική συσσώρευση του μετάλλου στο γόνο της πέστροφας η οποία εξαρτάται από τη δόση και το χρόνο έκθεσης και σημαντική μείωση στην ανάπτυξη τους.

Τα αποτελέσματα των πειραμάτων του Stouthart *et al.*, (1996), έδειξαν ότι μείωση στο pH του νερού οδηγεί σε αύξηση της τοξικότητας του μετάλλου κατά τα αρχικά στάδια ανάπτυξης του κυπρίνου (*Cyprinus Caprio*). Η αδυναμία πλήρωσης της νηκτικής κύστης των λαρβών με αέρα, κατά τη διάρκεια έκθεσης στο χαλκό σε περιβάλλον με pH 6,3, προκάλεσε δυσκολίες στα άτομα να διατηρήσουν τη θέση τους. Η πλήρωση με αέρα έγινε αμέσως μετά την εκκόλαψή τους, με την πρόσληψη αέρα από την επιφάνεια του νερού. Ο χαλκός φαίνεται να είναι υπεύθυνος για το σύνδρομο υπανάπτυξης της άνω σιαγόνας, καθιστώντας τις λάρβες ανίκανες να προσλάβουν αέρα. Επιπλέον φαίνεται να επηρεάζει το μηχανισμό ανταλλαγής αερίων για τη ρύθμιση της πλευστότητας των ψαριών.

Οι Lewis και Lewis, (1971), παρατήρησαν σε άτομα του είδους *Notemigonus crysoleucas* που εκτέθηκαν σε συγκέντρωση 5 mg/L CuSO₄, αύξηση της νευρικής και αδυναμία μάθησης. Στη συνέχεια παρατηρήθηκε νωθρότητα και παντελή έλλειψη ισορροπίας ενώ πέθαναν εντός 46 ωρών. Ένα στρώμα πηκτής βλέννας βρέθηκε στο βραγχιακό θάλαμο, και παρατηρήθηκε αξιοσημείωτη μείωση των διαλυμένων ουσιών στο αίμα (osmolality).

Οι Schreck και Lorz, (1978) παρατήρησαν σε άτομα σολομού (*Oncorhynchus kisutch*), ότι η έκθεσή τους στο χαλκό συνοδεύονταν από δοσοεξαρτώμενη αύξηση των επιπέδων κορτιζόλης.

Στα επιφανειακά ύδατα των ωκεανών η συγκέντρωση του μετάλλου είναι της τάξης των 1,0 nmol/L και πλησιάζει τα 3,0-5,0 nmol/L στα βαθύτερα στρώματα (Gunnar *et al.*, 2007). Γενικότερα θεωρείται ότι η μέση φυσιολογική συγκέντρωση του μετάλλου στο θαλασσινό νερό κυμαίνεται από 0,04-0,1 ppm

(Stickney, 2000), ενώ στο Αιγαίο παρατηρήθηκαν συγκεντρώσεις από 0,03-0,72μg/L (Scoulos *et al.*, 2005). Στην παρούσα εργασία, η ένωση που χρησιμοποιήθηκε ήταν ο ένυδρος θειικός χαλκός ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) και οι συγκεντρώσεις 0,1 και 0,5 ppm, συγκρίσιμες με τα επίπεδα ρύπανσης σε επιβαρυμένες περιοχές με αστικά και βιομηχανικά λύματα και σε επίπεδα χαμηλότερα της μέσης θανατηφόρου δόσης για τις 96 ώρες ($\text{LD}_{50} = 1,03 \text{ mg/L}$) (Wong *et al.*, 1999).

4.2 Εφαρμογές της τεχνικής «ανάλυσης κομητών»

Κύριες εφαρμογές της μεθόδου είναι: α) η μελέτη του μηχανισμού βλάβης του DNA και της βιολογικής σημασίας αυτής, β) η καταγραφή των μεταλλαξιογόνων και των καρκινογόνων ουσιών *in vivo* και *in vitro* γ) ο έλεγχος της δράσης των αντιοξειδωτικών ουσιών, και δ) ο συνδυασμός των παραπάνω για την εκτίμηση του στρες σε ζωντανούς οργανισμούς.

Ειδικότερα η μελέτη της επίδραση τοξικών ουσιών στο DNA υδρόβιων οργανισμών είναι σημαντική και συνδέεται με την καρκινογένεση· μια διαδικασία η οποία περιλαμβάνει τη συσσώρευση πολλών γενετικών ανωμαλιών και οδηγεί στον ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό των κυττάρων. Επιπρόσθετα, μέσω των γενετικών κυττάρων, η υψηλή δραστηριότητα των τοξικών ουσιών συνεισφέρει στη δημιουργία κληρονομικών ανωμαλιών, στην τερατογένεση και επηρεάζει την προσαρμοστικότητα των ατόμων στο φυσικό τους περιβάλλον. Στους υδρόβιους εκτρεφόμενους οργανισμούς τα προβλήματα αναπαραγωγής είναι σημαντικότερα από τα προβλήματα που προκαλούνται λόγω καρκινογένεσης (Mitchelmore and Chipman, 1998)

κυρίως για οικονομικούς λόγους, αλλά και για λόγους υγείας των καταναλωτών.

Ορισμένες εποχικές μεταβολές όπως για παράδειγμα, οι περιβαλλοντικές συνθήκες, η διαίτα και τα επίπεδα ορμονών στα άτομα είναι γνωστό ότι επηρεάζουν σημαντικά του ενζυμικούς μηχανισμούς που είναι υπεύθυνοι για την αποτοξίνωση τους. Η αξιολόγηση της τοξικότητας γενικά στους υδρόβιους οργανισμούς, είτε στο εργαστήριο, είτε στο πεδίο, γίνεται σε επίπεδο μορίων ή χρωμοσωμάτων. Η επίπτωση μιας μετάλλαξης στο DNA είναι δύσκολο να προβλεφθεί εκτός αν αναλυθεί και μελετηθεί λεπτομερώς και επισταμένως η συγκεκριμένη περιοχή του γονιδιώματος. Επιπλέον η φύση των μεταλλαξιογόνων παραγόντων είναι δύσκολο να προσδιοριστεί. Από την άλλη, συγκεκριμένες καρκινογόνες – μεταλλαξιογόνες ουσίες είναι δυνατό να ανιχνευτούν με την χρήση αντισωμάτων. Αυτή η πληροφορία είναι ενδεικτική για τη μεταβολή στο DNA, αλλά μόνο υποθέσεις μπορούμε να κάνουμε για τις επιπτώσεις που θα επακολουθήσουν, βασιζόμενοι στις γνώσεις που έχουμε για την καρκινογένεση. Εξειδικευμένη ανίχνευση των μεταλλαξιογόνων ουσιών είναι δύσκολο να γίνει στο πεδίο, λόγω της πληθώρας των τοξικών ουσιών και των περιορισμένων γνώσεων που διαθέτουμε για το σύνολό τους (Mitchelmore and Chipman, 1998).

Για πολλά χρόνια ήταν γνωστό ότι έκθεση σε καρκινογόνες ουσίες οδηγεί σε απώλεια της ακεραιότητας του DNA, και επομένως είναι σημαντικός ο υπολογισμός των θραυσμάτων των κλώνων του μορίου, ως δείκτη τοξικότητας (L. Shugart, 1990). Η δημιουργία θραυσμάτων συσχετίζεται με τις μεταλλαξιογόνες και καρκινογόνες ιδιότητες διαφόρων τοξικών ρυπαντών.

Οι μηχανισμοί που προκαλούν τη θραύση του μονόκλωνου ή δίκλωνου DNA, είναι πολλοί και διαφορετικοί. Όπως προαναφέρθηκε κερματισμός του DNA προκαλείται εκτός από την ιονίζουσα ακτινοβολία και στις ευαίσθητες σε αλκαλικό περιβάλλον περιοχές του DNA, με την επίδραση της υπεριώδους ακτινοβολίας, του ενεργού οξυγόνου, και άλλων δραστικών ενδιάμεσων χημικών προϊόντων. Επιπλέον είναι συχνή η δημιουργία θραυσμάτων κατά την επιδιόρθωση εκτομής. Κατά συνέπεια η μέτρηση των θραυσμάτων μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως μέσο εκτίμησης της τοξικότητας ενός ευρέως φάσματος τοξικών ουσιών που δρουν με τελείως διαφορετικούς τρόπους. Είναι σημαντική η παρατήρηση, ότι θραύσματα μπορούν να δημιουργηθούν μέσω μηχανισμών που δε σχετίζονται απευθείας με την τοξικότητα των παραγόντων. Η ενεργοποίηση ενζύμων όπως οι ενδονουκλεάσες και οι τοποϊσομεράσες (μέσω της ενδοκυτταρικής αύξησης του ελεύθερου ασβεστίου [McConkey *et al.*, 1988]) ενδέχεται να προκαλούν τη θραύση του DNA. Το ίδιο αποτέλεσμα μπορεί να προκληθεί και από την αύξηση της συγκέντρωσης ενδογενών δραστικών ουσιών, όπως υπεροξειδία και μονοξειδίο του αζώτου.

Η ευαισθησία και το μεγάλο εύρος εφαρμογής της μεθόδου ανεξάρτητα της φύσης των τοξικών παραγόντων, σε πολλούς τύπων κυττάρων και σε όλους τους οργανισμούς από τα βακτήρια ως τον άνθρωπο, μπορεί να φανεί χρήσιμη και πρακτική δίνοντας της το συγκριτικό πλεονέκτημα σε σχέση με τις υπόλοιπες τεχνικές όπως π.χ. τη micronucleus assay (μικροπυρηνική ανάλυση).

4.3 Συζήτηση αποτελεσμάτων της παρούσας εργασίας

Στη ρύπανση των υδάτων έχει εστιάσει η προσοχή τόσο της επιστημονικής κοινότητας όσο και της πολιτείας, αφού το περιβαλλοντικό ζήτημα επηρεάζει άμεσα τόσο την υγεία και την ευζωία ανθρώπων και λοιπών οργανισμών αλλά και την παγκόσμια οικονομία. Ειδικότερα, η ρύπανση των θαλάσσιων οικοσυστημάτων από τα ιόντα βαρέων μετάλλων λόγω φυσικών και κυρίως ανθρωπογενών δράσεων, είναι αντικείμενο μελέτης πολλών και διαφορετικών μεταξύ τους επιστημονικών πεδίων που συγκλίνουν για τα σχηματίσουν τον ειδικό κλάδο της οικοτοξικολογίας. Οι ιχθύες είναι ιδανικοί δείκτες της θαλάσσιας ρύπανσης και γενικότερα των υδάτινων οικοσυστημάτων επειδή καταλαμβάνουν διαφορετικές θέσεις στην τροφική αλυσίδα και ποικίλουν μεγέθους και ηλικίας.

Ο χαλκός και ο ψευδάργυρος είναι βασικά ιχνοστοιχεία για τους οργανισμούς και είναι παρόντες τόσο στα υδάτινη στήλη όσο και στα ιζήματα. Στην παρούσα εργασία αναφέρονται τα αποτελέσματα της επίδρασης των ιόντων των παραπάνω μετάλλων σε ηπατοκύτταρα τσιπούρας (*Sparus aurata*) με τη χρήση της τεχνικής «ανάλυσης κομητών». Η Gabbianelli *et al.* (2003), αναφέρει την επίδραση και το βιολογικό ρόλο που έχει ο ψευδάργυρος στην ενίσχυση της αντιγραφής του DNA, καθώς και των μηχανισμών επιδιόρθωσης των κυττάρων. Αντίστοιχα για το χαλκό αναφέρει ότι έχει προστατευτική αντιοξειδωτική δράση, αφού ως συμπαραγοντας (cofactor) συμμετέχει σε πολλά αντιοξειδωτικά ένζυμα. Από τα αποτελέσματα της εργασίας της, θεωρεί ότι η υπερβολική έκθεση στο χαλκό προκαλεί βλάβη στο DNA με έμμεσο τρόπο, μέσω της πρόκλησης οξειδωτικού στρες με την

παραγωγή ενεργών μορφών οξυγόνου (ROS). Σε φυσιολογικές συνθήκες, οι ενεργές μορφές οξυγόνου εξουδετερώνονται από τη δράση των αντιοξειδωτικών ενζύμων. Ως συμπέρασμα από την εργασία της προκύπτει, ότι όταν η αντιοξειδωτική δράση των κυττάρων μειώνεται, αυτό οδηγεί σε αύξηση του ποσοστού του κερματισμένου DNA.

Η «ανάλυση κομητών», όπως αναφέρθηκε, είναι μια πρακτική μέθοδος για την εκτίμηση της γενοτοξικότητας, τη μελέτη επίδρασης των μηχανισμών επιδιόρθωσης ή για την παρακολούθηση-καταγραφή πληθυσμών που εκτίθενται σε μεταλλαξιογόνες ουσίες. Έχει ευρεία εφαρμογή στην εκτίμηση της γενοτοξικότητας τόσο *in vivo* όσο και *in vitro*, με πλήθος εφαρμογών στον κλάδο της οικοτοξικολογία σε σχεδόν όλους τους ζωντανούς οργανισμούς (Rojas *et al.*, 1999). Δείγματα λαμβάνονται, προετοιμάζονται, επεξεργάζονται και αξιολογούνται πολύ εύκολα με οπτική καταμέτρηση ή με τη χρήση συστημάτων ανάλυσης εικόνας. Επιπλέον είναι μια τεχνική σχετικώς φθηνή και μελέτες μπορούν να πραγματοποιηθούν με χαμηλό προϋπολογισμό. Τα δεδομένα επεξεργάζονται εύκολα και αποτελεσματικά. Μερικές φορές η ερμηνεία των αποτελεσμάτων παρουσιάζει δυσκολίες και είναι αναγκαία η προσέγγισή με την ενδεδειγμένη στατιστική ανάλυση, που αλλάζει από περίπτωση σε περίπτωση ανάλογα με τη φύση των δεδομένων. Μερικές από τις στατιστικές αναλύσεις αν και δίνουν διαφορετικά αριθμητικά αποτελέσματα οδηγούν στα ίδια συμπεράσματα ενώ άλλες που οδηγούν σε διαφορετικά συμπεράσματα είναι ένδειξη ότι χρειάζεται προσεκτικότερος έλεγχος των δεδομένων.

Μερικές φορές, ένα καθαρό αποτέλεσμα που αποτυπώνεται από την τεχνική της ανάλυσης κομητών π.χ. με την καταγραφή υψηλών τιμών TM, δε

δηλώνει πάντα και έναν υψηλό γενοτοξικό κίνδυνο. Πολλές έρευνες έδειξαν ότι η συγκεκριμένη τεχνική καταγράφει γενοτοξικές βλάβες που οφείλονται στις ρίζες οξυγόνου, αλλά σε συγκεντρώσεις που είναι χαμηλότερες από αυτές που παρατηρήθηκε ότι προκαλούν τις κυτταρογενετικές βλάβες ή μεταλλάξεις. Επίσης, μελέτες στον άνθρωπο όπου εφαρμόστηκε η τεχνική της «ανάλυσης κομητών», κατέγραψαν βλάβη στο DNA χωρίς τα άτομα να έχουν εκτεθεί σε γενοτοξικούς παράγοντες. Ενδεικτικά, ορισμένοι παράγοντες που προκαλούν σύγχυση και παρατηρείται υψηλό ποσοστό κερματισμένου DNA είναι η έντονη φυσική άσκηση, οι μεταβολικές διαταραχές και οι εποχιακές μεταβολές π.χ. έκθεση σε υψηλές ή χαμηλές θερμοκρασίες. Αυτοί φαίνεται να επιδρούν στο DNA παρότι μέχρι στιγμής δεν έχει αποδειχθεί η ενοχή τους από τους αντίστοιχους κυτταρογενετικούς ελέγχους. Κομήτες που προέρχονται από γενοτοξικούς παράγοντες («κακοί» κομήτες) και κομήτες που προέρχονται από φυσιολογικές διεργασίες («καλοί» κομήτες), έχουν τα ίδια μορφομετρικά χαρακτηριστικά (δεν φαίνονται μόνο ίδιοι αλλά είναι – ως αποτέλεσμα του κερματισμού του DNA) και είναι δύσκολο να διακριθούν.

Ποιοι είναι όμως οι κύριοι μηχανισμοί σχηματισμού ενός κομήτη; Η αλκαλική εκδοχή της «ανάλυσης κομητών» που εφαρμόστηκε από το Singh *et al.* (1988), είναι κατάλληλη όχι μόνο στην ανίχνευση θραυσμάτων DNA, αλλά και στην ανίχνευση των ευαίσθητων περιοχών του μορίου σε αλκαλικό περιβάλλον, των μορφών διασκελισμού (χιάσματα) και των μεταβατικών σταδίων θραύσης που οφείλονται στη διαδικασία της επιδιόρθωσης. Στη διάρκεια των τελευταίων ετών, οι μελέτες και οι εφαρμογές της «ανάλυσης των κομητών» αυξήθηκαν. Η τεχνική εφαρμόστηκε ευρέως πριν ακόμα ερευνηθούν οι μηχανισμοί δημιουργίας της ουράς των κομητών. Οι Ostling και

Johansson (1984), πρότειναν ένα μοντέλο το οποίο σε ουδέτερο περιβάλλον η δημιουργία εγκοπών (σπασίματα) στο μόριο του DNA οδηγεί στη δημιουργία θηλιών (βρόγχων) οι οποίες ξετυλίγονται κατά τη διάρκεια της ηλεκτροφόρησης για να σχηματίσουν την ουρά του κομήτη. Η αποπεριέλιξη των θηλιών προτάθηκε επίσης ως κύρια αιτία για το σχηματισμό του κομήτη υπό αλκαλικές συνθήκες και από τον Collins *et al.*, (1997). Ο Klaude *et al.*, (1996), απέδειξε ότι η ουρά του κομήτη σε ουδέτερες συνθήκες αποτελείται από θηλιές ενώ σε αλκαλικό περιβάλλον αποτελείται από θραύσματα DNA. Ένας άλλος ενδιαφέρον μηχανισμός σχηματισμού της ουράς του κομήτη προτάθηκε και από τους Singh και Stephens (1997): υπέθεσαν ότι ορισμένες εγκοπές (σπασίματα) στον έναν κλώνο του DNA, αντιστοιχούσαν στην ύπαρξη συμπλόκων DNA-πρωτεϊνών. Πρότειναν λοιπόν την απομάκρυνση των εναπομεινάντων πρωτεϊνών, ώστε να αυξηθεί η ευαισθησία της τεχνικής.

Τι μετράμε όμως στην πράξη με την εφαρμογή της αλκαλικής εκδοχής της «ανάλυσης κομητών» που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία; Πρέπει να ληφθεί υπόψη ότι η βλάβη στο DNA που ανιχνεύεται, οφείλεται κυρίως σε θραύσεις που έχουν μεταβατικό χαρακτήρα. Δηλαδή, το ποσοστό του κερματισμένου DNA που μετράμε, αντιπροσωπεύει μια σταθερή δυναμική κατάσταση, που ισορροπεί μεταξύ της «εισαγωγής»-δημιουργίας της βλάβης και της επιδιόρθωσής της (Dusinska and Collins, 2008).

Ο σκοπός της παρούσας εργασίας ανάγεται λοιπόν στη μέτρηση-εκτίμηση αυτής της σταθερής δυναμικής κατάστασης (βλάβης-επιδιόρθωσης) υπό την επίδραση (οξεία τοξικότητα) των βαρέων μετάλλων χαλκού και ψευδαργύρου τόσο σε ηπατοκύτταρα που προήλθαν από ζωντανούς ιχθύες (*in vivo*), όσο και σε ηπατοκύτταρα που καλλιιεργήθηκαν σε περιβάλλον

ελεύθερο από ιόντα χαλκού και ψευδαργύρου με προέλευση τα ίδια άτομα που εκτέθηκαν στους παραπάνω γενοτοξικούς παράγοντες (*ex vivo*).

Η αλκαλική εκδοχή της «ανάλυσης κομητών», ανιχνεύει λοιπόν τον κερματισμό τμημάτων του DNA που οφείλεται σε πληθώρα αιτιών όπως: άμεσες θραύσεις στον έναν ή και στους δύο κλώνους που προκαλούνται από τους γενοτοξικούς παράγοντες, ενδιάμεσα παράγωγα των μηχανισμών επιδιόρθωσης, ακόμα και θραύσματα που συνδέονται με την αντιγραφή. Μελέτες *in vitro* έδειξαν ότι οι κομήτες που δημιουργούνται μετά από έκθεση σε μεταλλαξιγόνες ουσίες ή μετά από έντονη φυσική άσκηση, είναι αποτέλεσμα των μηχανισμών επιδιόρθωσης εκτομής, δηλαδή εκδηλώνονται ως αντίδραση άμυνας των οργανισμών στους γενοτοξικούς παράγοντες (Speit and Hartmann, 1995).

Λαμβάνοντας υπόψη όλα τα παραπάνω, στην παρούσα εργασία καταγράφηκε καθαρά η δόσοεξαρτώμενη σχέση στα άτομα που εκτέθηκαν στο χαλκό σε διαφορετικές συγκεντρώσεις 0,1 και 0,5 ppm και στους δύο χρόνους έκθεσης (24 και 96 ώρες), τόσο *in vivo* όσο και *ex vivo* ενώ φαίνεται ότι ο χρόνος έκθεσης δεν επηρεάζει το ποσοστό βλάβης του DNA. Αυτό ίσως να οφείλεται στην ενεργοποίηση μηχανισμών που σχετίζονται με την ομοιόσταση του μετάλλου στα ηπατοκύτταρα που έχει ως αποτέλεσμα την αποβολή του. Επιπρόσθετα, οι βλάβες που προκαλεί στο DNA η έκθεση στα ιόντα του μετάλλου με έμμεσο τρόπο μέσω της παραγωγής ενεργών μορφών οξυγόνου (ROS), ενδεχομένως να ενεργοποιεί επιπλέον και αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς περιορίζοντας ακόμα περισσότερο τη γενοτοξική δράση του μετάλλου.

Σε ότι αφορά το ψευδάργυρο, δοσοεξαρτώμενη σχέση παρατηρείται *in vivo* ενώ *ex vivo* το ποσοστό βλάβης του DNA εξαρτάται από το χρόνο έκθεσης στο μέταλλο. Η διαφορά που παρατηρείται μεταξύ των δύο μετάλλων ενδεχομένως να οφείλεται σε διαφορετικής φύσης βλάβες που προκαλούν τόσο στο μόριο του DNA όσο και στην επίδραση που πιθανώς έχουν στους μηχανισμούς επιδιόρθωσης των κυττάρων. Έτσι *ex vivo*, η έκθεση σε χαμηλή συγκέντρωση στον ψευδάργυρο φαίνεται να προκαλεί άμεση βλάβη στο DNA αλλά και να ενισχύει την ενεργοποίηση των μηχανισμών επιδιόρθωσης, οδηγώντας σε υψηλότερες τιμές TM ενώ η έκθεση σε υψηλότερη συγκέντρωση, φαίνεται να προκαλεί αύξηση της βλάβης του DNA και πιθανή αναστολή των μηχανισμών επιδιόρθωσης. Όπως αναφέρθηκε στην εισαγωγή, ο ψευδάργυρος είναι σημαντικό στοιχείο για τη δράση 300 περίπου ενζύμων όντας απαραίτητος για το σχηματισμό δακτύλων ψευδαργύρου που συμμετέχει στο σχηματισμό της τριτοταγής δομή τους. Επιπλέον εμπλέκεται στη σηματοδοτική οδό των μεταλλοθειονίνων και θειονίνων που έχουν αντιοξειδωτική δράση, στην αντιγραφή και μεταγραφή του DNA και στην πρωτεϊνοσύνθεση. Η αρνητική δοσοεξαρτώμενη συσχέτιση που παρατηρείται *ex vivo*, εκτός από την αναστολή των μηχανισμών επιδιόρθωσης στην έκθεση σε υψηλή συγκέντρωση, ενδεχομένως να οφείλεται και στην ιδιότητα των οργανισμών να κατανέμουν σε διαφορετικά όργανα τις τοξικές ουσίες με διαφορετικό τρόπο, ανάλογα με το ύψος της συγκέντρωσης, τη φύση της ουσίας και το χρόνο έκθεσης (Augustyniak *et al.* 2006),

Εν κατακλείδι, η «ανάλυση κομητών αντιπροσωπεύει μια χρήσιμη τεχνική για την εκτίμηση των βιολογικών επιπτώσεων της περιβαλλοντικής ρύπανσης από βαρέα μέταλλα σε υδρόβιους οργανισμούς, όντας ευαίσθητη

στην ανίχνευση βλάβης του DNA. Χρειάζεται όμως ιδιαίτερη προσοχή στην ερμηνεία των αποτελεσμάτων και στη χρήση στατιστικών εργαλείων για την ανάλυση των δεδομένων. Ο χαλκός και ο ψευδάργυρος φαίνεται να επιδρούν γενotoξικά στα ηπατοκύτταρα της τσιπούρας αλλά να έχουν διαφορετικό τρόπο δράσης. Ο χαλκός φαίνεται να αντιμετωπίζεται από τα κύτταρα κυρίως με την ενεργοποίηση μηχανισμών αποβολής (περισσότερο στα 0,1 ppm και λιγότερο στα 0,5 ppm), ενώ ο ψευδάργυρος φαίνεται να επιδρά στους μηχανισμούς που εμπλέκονται με την επιδιόρθωση του DNA.

Τα συμπεράσματα της παρούσας εργασίας συνοψίζονται ως εξής:

- Με την καλλιέργεια των ηπατοκυττάρων οι διαφορές μεταξύ των μεταχειρίσεων είναι περισσότερο διακριτές αυξάνοντας την ευαισθησία της μεθόδου.
- Επίσης ανιχνεύεται μεγαλύτερο ποσοστό βλάβης στο DNA που βοηθά στην κατανόηση της συμμετοχής των μηχανισμών επιδιόρθωσης και στο κατά πόσον αυτοί επηρεάζονται από τη γενotoξική δράση των βαρέων μετάλλων.
- Σε συνδυασμό με τα δεδομένα που προέρχονται από την *in vivo* διαδικασία μπορούμε να εκτιμήσουμε το είδος της βλάβης που προκαλεί ο γενotoξικός παράγοντας και την επίδραση του στους μηχανισμούς επιδιόρθωσης.
- Χαλκός και ψευδάργυρος έχουν γενotoξική δράση στις συγκεντρώσεις που εξετάστηκαν στην παρούσα εργασία, αλλά διαφέρουν μεταξύ τους ως προς τον τρόπο πρόκλησης της βλάβης και εξουδετέρωσης τους από τα κύτταρα.

5. Βιβλιογραφία

1. **Augustyniak M., Juchimiuk J., Przybyłowicz W. J., Mesjasz-Przybyłowicz J., Babczyńska A., Migula P. (2006).** Zinc-induced DNA damage and the distribution of metals in the brain of grasshoppers by the comet assay and micro-PIXE. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C*, 144: 242–251.
2. **Bagdonas E., and Vosyliene M. Z. (2006).** A study of toxicity and genotoxicity of copper, zinc and their mixture to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) *Biologija* 1: 8-13
3. **Baksi S. M., Frazier J. M. (1990).** Isolated hepatocytes—model systems for toxicology research. *Aquatic Toxicology*, 16:229–259.
4. **Baksi S.M. and Frazier J.M. (1990).** Review. Isolated fish hepatocytes-model system for toxicology research. *Aquatic Toxicology*, 16:229-256.
5. **Barnabe G. (1990).** Rearing bass and gilthead sea bream. In: *Aquaculture vol. 2.*, Ellis Horwood, London: 647-686
6. **Bauchot M.L., Hureau J.C. (1986).** *Sparidae*. In: *Fishes of North-eastern Atlantic and Mediterranean*. Whitehead, P.J., M.L. Bauchot, J.C. Hureau, J. Nielsen and E. Tortonese, UNESCO United Kingdom:883-907.
7. **Bengtsson B-E. (1974a).** Effect of zinc on growth of the minnow *Phoxinus phoxinus*. *Oikos*, 25:370-373.
8. **Bengtsson B-E. (1974b).** Vertebral damage to minnows *Phoxinus phoxinus* exposed to zinc. *Oikos*, 25:134-139.
9. **Biney C., Amazu A. T., Calamari D., Kaba N., Mbome I. L., Naeve H.,**

- Ochumba P. B. O., Osibanjo O., Radegonde V. and Saad, M. A. H. (1994).** Review of heavy metals in the African aquatic environment. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 31:134-159.
10. **Breber P., Strada R. M. (1995).** Research for bioindicators as quality criteria for lagoons. *Biol. Mar. Mediterr.*, 2:119-120.
 11. **Brezonik P. L., King S. O. and Mach C. E. (1991).** The influence of water chemistry on trace metal bioavailability and toxicity to aquatic organisms. *Metal ecotoxicology. Concepts and applications.* Eds. Newman, M.C. and McIntosh, A.W. Lewis Publishers, Michigan. 399 pp.
 12. **Brungs, W. A. (1969).** Chronic toxicity of zinc to the fathead minnow, *Pimephales promelas* Rafinesque. *Transactions of the American Fisheries Society*, 2: 272-279.
 13. **Cairns J. and Mount D. I. (1990).** Aquatic toxicology. *Environmental Science and Technology*, 24: 154-160.
 14. **Chavanne H., Chatain B., Haffary P. and Batargias K. (2008).** Review on breeding and reproduction of European aquaculture species. Gilthead Seabream (*Sparus aurata* L.). *Aqua Breeding*
 15. **Collins A. R., Dobson V. L., Dusinska M., Kennedy G., Stetinad R. (1997).** The comet assay: what can it really tell us? *Mutation Research*, 375:183–193.
 16. **Collins, A. R., Duthie, S. J., and Dobson, V. L. (1993).** Direct enzymic detection of endogenous oxidative base damage in human lymphocyte DNA. *Carcinogenesis* 14:1733–1735.
 17. **Crandal C. A. and Goodnight C. J. (1962).** Effects of sub-lethal concentrations of several toxicants on growth of the common guppy,

- Lebistes reticulatus*. Limnology and Oceanography, 7:233-239.
18. **Crespo S. and Balasch J. (1980).** Mortality, accumulation, and distribution of zinc in the gill system of the dogfish following zinc treatment. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 24:940-944.
 19. **Dallas H.F. and Day J.A. (1993).** The effect of water quality variables on riverine ecosystems: A review. Water Research Commission Project No. 351. Water Research Commission, Pretoria, South Africa: 240.
 20. **Dennog, C., Hartmann, A., Frey, G., and Speit, G. (1996).** Detection of DNA damage after hyperbaric oxygen (HBO) therapy. Mutagenesis 11: 605–609.
 21. **Devaux A., Pesonens M. and Monod G. (1997).** Alkaline comet assay in rainbow trout hepatocytes. Toxicology in Vitro, 11:71-79.
 22. **Dusinska M. and Collins A. R. (2008).** The comet assay in human biomonitoring: gene-environment interactions. Mutagenesis, 23:191-205.
 23. **EIFAC Working party on water quality criteria for European freshwater fish. (1978).** Report on Copper and Freshwater Fish. *Water Research*. 12: 277-280.
 24. **Fischer W., Schneider M., Bauchaut M.L. (1987).** Fiches FAO Catalogue d' identification des especes pour les besoins de la peche. Mediterranee et Mer Noire, (Zone de peche 37), Rev. I, Vol. II Vertebres. FAO CEE, Rome: 761-1529.
 25. **Fusco, J. C., Afshari, A. J., George, M. H., et al. (1996).** In vivo genotoxicity of dichloroacetic acid: evaluation with the mouse peripheral blood micronucleus assay and the single cell gel assay. Environmental

- and Molecular Mutagenesis, 27:1–9.
26. **Gabbianelli R., Lupidi G., Villarini M., Falcioni G. (2003).** DNA Damage Induced by Copper on Erythrocytes of Gilthead Sea Bream *Sparus aurata* and Mollusk *Scapharca inaequivalvi*. Archives of Environmental Contamination Toxicology, 45:350–356
 27. **Ghillibaert F., Chaillou C., Deschamps F. and Roubaud P. (1995).** Toxic effects, at three pH levels, of two reference molecules on common carp embryo. Ecotoxicology and Environmental Safety, 32:19-28.
 28. **Gómez S., Villar C. and Bonetto C. (1998).** Zinc toxicity in the fish *Cnesterodon decemmaculatus* in the Paranà River and Rìo de La Plata Estuary. Environmental Pollution, 99:159-165.
 29. **Gunnar F. Nordberg, Bruce A. Fowler, Monica Nordberg (2007).** chapter 13 Ecotoxicology of Metals—Sources, Transport, and Effects in the Ecosystem in: Handbook on the toxicology of metals 3rd ed. Academic Press, New York: 251-280
 30. **Handy R.D., Sims D.W., Giles A., Campbell H.A. and Musonda M.M. (1999).** Metabolic trade-off between locomotion and detoxification for maintenance of blood chemistry and growth parameters by rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) during chronic dietary exposure to copper. Aquatic Toxicology, 47: 23-41.
 31. **Hansen H. J. M., Olsen A. G. and Rosenkilde P. (1996).** The effect of Cu on gill and esophagus lipid metabolism in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Comparative Biochemistry and Physiology, 113:23-29.
 32. **Hartmann, A., Herkommer, K., Glóck, M., and Speit, G. (1995).** The

- DNA-damaging effect of cyclophosphamide on human blood cells in vivo and in vitro studied with the single cell gel test (SCG). *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 25:180–187.
33. **Heath A. G. (1987).** Water pollution and fish physiology. CRT Press, Florida: 245.
 34. **Henderson I., Wolfreys A, Fedyk J., Bournier C., and Windebank S. (1998).** The ability of the Comet assay to discriminate between genotoxins and cytotoxins. *Mutagenesis*, 13:89-94.
 35. **Holcombe G. W., Benoit D. A. and Leonard E. N. (1979).** Long-term effects of zinc exposures on brook trout (*Salvelinus fontinalis*). *Transactions of the American Fisheries Society*, 108:76-87.
 36. **Hoogstrand C., Wilson, R. W., Polgar D. and Wood C. M. (1994).** Effects of zinc on the kinetics of branchial calcium uptake in freshwater rainbow trout during adaptation to waterborne zinc. *Journal of Experimental Biology*, 168: 55-73.
 37. **Horning W.B. and Neiheisel T.W. (1979).** Chronic Effect of Copper on the Bluntnose Minnow *Pimephales notatus* (Rafinesque). *Archives of Environmental Contamination Toxicology*, 8: 545-552.
 38. **James R., Sampath K. and Selvamani P. (1998).** Effect of EDTA on reduction of copper toxicity in *Oreochromis mossambicus* (Peters). *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 60:487-493.
 39. **Johnson MK, Loo G. (2000).** Effects of epigallocatechin and quercetin on oxidative damage to cellular DNA. *Mutation Research*, 459: 211-218, 233
 40. **Kargin F. and Cogun H. Y. (1999).** Metal interactions during accumulation and elimination of zinc and cadmium in tissues of the

- freshwater fish, *Tilapia nilotica*. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 63: 511-519.
41. **Klaude M., Ericson S., Nygren J. and Ahnström G. (1996).** The comet assay: mechanisms and technical considerations Mutation Research, 363: 89-96
 42. **Kotze P., Du Preez H. H. and Van Vuren J. H. J. (1999).** Bioaccumulation of copper and zinc in *Oreochromis mossambicus* and *Clarias gariepinus*, from the Olifants River, Mpumalanga, South Africa. Water SA, 25: 99-110.
 43. **L. Shugart, (1990).** Biological monitoring: testing for genotoxicity, in: Biomarkers of Environmental Contamination, Lewis Publishers, Chelsea: 217–227.
 44. **Landing W. M., Cutter G. A., Dalziel J. A., Flegal A.R., Powell R. T., Schmidt D., Shiller A., Statham P., Westurlund S., Resing J. (1995).** Analytical intercomparison results from the 1990 Intergovernmental Oceanographic Commission Open-Ocean Baseline Survey for trace metals: Atlantic Ocean. Marine Chemistry, 49: 253–265.
 45. **Lawrence J.N., Foster B. and Benford D.J. (1991).** The application of a wedge perfusion technique to the in vivo-in vitro rat hepatocyte DNA-repair assay. Mutation Research, 252:129-137
 46. **Lewin, B. (2004).** Recombination and repair. In: Genes VIII. 1st ed., Pearson Prentice Hall, New Jersey: 419-462
 47. **Lewis S.D. and Lewis, W.M. (1971).** The effect of zinc and copper on the osmolality of blood serum of the channel catfish (*Ictalarius punctatus*) Rafinesque, and golden shiner (*Notemigonus crysoleucas*)

- Mitchell. Transactions of the American Fisheries Society. 100:639-643.
48. **Marr, J.C.A., Lipton J., Cacela D., Hansen J.A., Bergman H.L., Meyer J.S. and Hogstrand C. (1996).** Relationship between copper exposure duration, tissue copper concentration, and rainbow trout growth. *Aquatic Toxicology*, 36:17-30.
 49. **Martínez M., Del Ramo J., Torreblanca A. and Díaz-Mayans J. (1999).** Effect of cadmium exposure on zinc levels in the brine shrimp *Artemia parthenogenetica*. *Aquaculture*, 172:315-325.
 50. **Mason C.F. (1991).** Biology of Freshwater Pollution, Second Edition. Longman Group UK Ltd., England. 351pp.
 51. **McConkey D.J., Hartzell P., Nicotera P., Wyllie A.H., Orrenius S. (1988).** Stimulation of endogenous endonuclease activity in hepatocytes exposed to oxidative stress, *Toxicology Letters*, 42:123–130.
 52. **McKelvey-Martin V.J., Green M.H.L., Schmezer P., Pool-Zobel B.L., De Meo M.P. and Collins A. (1993).** The single cell gel electrophoresis assay (comet assay): A European review. *Mutation Research*, 288 :47-63.
 53. **Merk, O. and Speit, G. (1998).** Significance of formaldehyde-induced DNA-protein crosslinks for mutagenesis. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 32:260–268.
 54. **Mitchelmore CL, Chipman JK. (1998).** DNA strand breakage in aquatic organisms and the potential value of the comet assay in environmental monitoring. *Mutation Research*, 399: 135–147.
 55. **Munger C., Hare L., Craig A. and Charest P-M. (1999).** Influence of exposure time on the distribution of cadmium within the cladoceran

- Ceriodaphnia dubia*. Aquatic Toxicology, 44:195-200.
56. **Nussey G. (1998).** Metal Ecotoxicology of the Upper Olifants River at Selected Localities and the Effect of Copper and Zinc on Fish Blood Physiology. Ph.D-thesis, Rand Afrikaans University, South Africa.
 57. **Olive, P. L. (1989).** Cell proliferation as a requirement for development of contact effect in Chinese hamster V79 spheroids. Radiation Research, 117:79–92.
 58. **Ostling O., Johanson KJ. (1984).** Microelectrophoretic study of radiationinduced DNA damages in individual mammalian cells. Biochemistry and Biophysics Research Community, 123:291–298
 59. **Pelgrom S. M. G. J., Lamers L. P. M., Garritsen J. A. M., Pels B. M., Lock R. A. C., Balm P. H. M. and Wendelaar Bonga S. E. (1994).** Interactions between copper and cadmium during single and combined exposure in juvenile tilapia *Oreochromis mossambicus*: Influence of feeding condition on whole body metal accumulation and the effect of the metals on tissue water and ion content. Aquatic Toxicology, 30: 117-135.
 60. **Pfuhler, S. and Wolf, H. U. (1996).** Detection of DNA-crosslinking agents with the alkaline comet assay. Environmental and Molecular Mutagenesis, 27:196–201.
 61. **Rapp, A., Bock, C., Dittmar, H., and Greulich, K. O. (2000).** UV-A breakage sensitivity of human chromosomes as measured by COMET-FISH depends on gene density and not on the chromosome size. Journal of Photochemistry and Photobiology, 56:109–117.
 62. **Rattner B. A. and Heath A. G. (1995).** Environmental factors affecting

- contaminant toxicity in aquatic and terrestrial vertebrates. In: Handbook of Ecotoxicology. Lewis Publishers, Boca Raton 519–537.
63. **Rayms-Keller A., Olson, K. E., McGraw M., Oray C., Carlson J. O. and Beaty B. J. (1998).** Effect of heavy metals on *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) larvae. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 39: 41-47.
 64. **Rishi K. K. and Jain M. (1998).** Effect of toxicity of cadmium on scale morphology in *Cyprinus carpio* (Cyprinidae). *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 60: 323-328.
 65. **Robert R. Stickney (2000).** Pollution In: *ENCYCLOPEDIA OF AQUACULTURE* 1st ed., Wiley-Interscience Publication, New York: 656-657.
 66. **Rojas E., Valverde M., Sordo M., Ostrosky-Wegman P. (1996).** DNA damage in exfoliated buccal cells of smokers assessed by the single cell gel electrophoresis assay. *Mutation Research*, 370:115-120.
 67. **Santos, S. J., Singh, N. P., and Natarajan, A. T. (1997).** Fluorescence in situ hybridization with comets. *Experimental Cell Research*, 232:407–411.
 68. **Sauvaigo, S., Serres, C., Signorini, N., Emonet, N., Richard, M. J., and Cadet, J. (1998).** Use of the single cell gel electrophoresis assay for the immunofluorescent detection of specific DNA damage. *Analytical Biochemistry*, 259:1–7.
 69. **Schreck C.B. and Lorz H.W. (1978).** Stress response of Coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) Elicited by Cadmium and Copper and Potential Use of cortisol as an Indicator of Stress. *Journal of the Fisheries*

Research Board of Canada, 35:1124-1129.

70. **Scoulos M., Giannopoulou K., Sakellari A., Paraskevopoulou V., and Dassenakis M. (2005).** « Cadmium, Copper, Lead and Zinc in Saronikos gulf in 2004 » Proceedings of the 9th International Conference on Environmental Science and Technology Rhodes island, Greece, 1-3 Sept 2005.
71. **Sehgal R. and Saxena A.B. (1986).** Toxicity of zinc to a viviparous fish *Lebistes reticulatus* (Peters). Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 36:888-894.
72. **Seymore T. (1994).** Bioaccumulation of Metals in *Barbus marequensis* from the Olifants River, Kruger National Park and Lethal Levels of Manganese to Juvenile *Oreochromis mossambicus*. M.Sc-thesis, Rand Afrikaans University, South Africa.
73. **Singh N.P. and Stephens R.E. (1997).** Microgel electrophoresis: sensitivity, mechanism, and DNA electrostretching. Mutation Research, 383:167-175.
74. **Singh, N. P., McCoy, M. T., Tice, R. R., and Schneider, E. L. (1988).** A simple technique for quantification of low levels of DNA damage in individual cells. Experimental Cell Research, 175:184–191.
75. **Somasundaram B., King P. E. and Shackley S. (1984).** The effects of zinc on postfertilization development in eggs of *Clupea harengus* L. Aquatic Toxicology, 5:167-178.
76. **Sorensen, E.M.B. (1991).** Metal poisoning in fish. CRC Press, Boca Ration, Florida: 374
77. **Spehar R. L. (1976).** Cadmium and zinc toxicity to flagfish, *Jordanella*

- floridae*. Journal of the Fisheries Research Board of Canada, 33:1939-1945.
78. **Speit, G. and Hartmann, A. (1995).** The contribution of excision repair to the DNA-effects seen in the alkaline single cell gel test (comet assay). *Mutagenesis* 10:555–559.
 79. **Stagg R.M. and Shuttleworth T.J. (1982).** The accumulation of copper in *Platichthys flesus* L. and its effects on plasma electrolyte concentrations. *Journal of Fish Biology*, 20:491-501.
 80. **Steemann N. E. and Wium-Andersen, S. (1970).** Copper ions as poison in the sea and in freshwater. *Marine Biology*, 6: 93-97.
 81. **Stouthart X., Haans J.L.M., Lock A.C. and Wendelaar S.E. (1996).** Effects of water pH on copper toxicity to early life stages of the common carp (*Cyprinus carpio*). *Environmental Toxicology and Chemistry*, 15: 376-383.
 82. **Strydom C., Robinson C., Pretorius E., Whitcutt J. M., Marx J. and Borman M. S. (2006).** The effect of selected metals on the central metabolic pathways in biology: A review. *Water SA*, 32:543-548.
 83. **Tice, R. R. (1995).** The single cell gel/comet assay: a microgel electrophoretic technique for the detection of DNA damage and repair in individual cells, in *Environmental Mutagenesis* (Phillips, D. H. and Venitt, S., eds.), BIOS Scientific Publishers, Oxford: 315–339.
 84. **Van Der Merwe M., Van Vuren J. H. J. and Du Preez H. H. (1993).** Lethal copper concentration levels for *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822) – a preliminary study. *Koedoe*, 36:77-86.
 85. **Viarengo J. S. (1985).** Biochemical effects of trace metals. *Marine*

- Pollution Bulletin, 16:153- 158.
86. **Viljoen A. (1999).** Effects of zinc and copper on the post ovulatory reproductive potential of the sharptooth catfish *Clarias gariepinus*. M.Sc-thesis, Rand Afrikaans University, South Africa.
 87. **Welsh P.G., Skidmore J.F., Spry D.J. Dixon D.G., Hodson P.V., Hutchinson N.J. and Hickie B.E. (1993).** Effect of pH and dissolved organic carbon on the toxicity of copper to larval fathead minnow (*Pimephales promelas*) in natural lake waters of low alkalinity. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 50:1356-1362.
 88. **Wepener V., Van Vuren J. H. J. and Du Preez H. H. (2001).** Uptake and distribution of a copper, iron and zinc mixture in gill, liver and plasma of a freshwater teleost, *Tilapia sparmanii*. Water SA. 27: 99-108.
 89. **Witeska, M., Jezierska B. and Chaber J. (1995).** The influence of cadmium on common carp embryos and larvae. Aquaculture, 129: 129-132.
 90. **Wong P. P. K., Chu L.M. and Wong C. K. (1999).** Study of toxicity and bioaccumulation of copper in the silver sea bream *Sparus sarba* Environment International, 25: 417-422.
 91. **Zar, J., H. (1996).** Biostatistical analysis. 2nd Edition. Prentice Hall, New Jersey, USA.

6. Abstract

Water pollution has focused the attention of both the scientific community and the public on environmental problems. Not only does water pollution affect the health and welfare of people and organisms, but it also damages vegetation and properties.

Metals are elements found naturally in aquatic ecosystems due to various processes such as weathering and erosion. Some of these metals are essential to living organisms in trace amounts (for example copper and zinc). Essential trace elements have a narrow optimal concentration range for growth and reproduction, and both excess and shortage can be detrimental to organisms, with unusually high concentrations becoming toxic to aquatic organisms.

Fish are ideal indicators of heavy metal contamination in aquatic systems because they occupy different trophic levels and are of different sizes and ages. In particular, copper and zinc are essential trace metals for living organisms and they are present in all natural waters and sediments. In this thesis, we report data on the effect of copper and zinc on DNA hepatocytes from the teleost gilthead sea bream *Sparus aurata*. In particular, the effects of 0.1 and 0.5 ppm of Cu and 0.2 and 1.0 ppm of Zn on the nucleated hepatocytes were analyzed using the “comet assay.”

Gilthead sea bream *Sparus aurata* were obtained from a local breeding farm in Vorios Euvoikos and were maintained at the university animal house in tanks containing seawater (500 liters) at a temperature of 17-

20°C. Animals were treated with above mentioned concentration of CuSO₄ and ZnCl₂ for 24 and 96 hours. Hepatocytes from *Sparus aurata* were isolated and washed three times with appropriate buffer used for collection of the samples and proceed to the comet assay phase (*in vivo* treatment).

In order to assess both damage and repair, an aliquot of isolated hepatocytes, of previous phase, was incubated in cell culture (metals free) for 2 hour in room temperature at 22 C, to develop repair activity (*ex vivo* treatment), and measured the TM.

The comet assay was performed under alkaline conditions essentially according to the procedure of Singh (1988). This technique permits quantification of DNA damage by evaluating different parameters of the comet assay. In this thesis was used tail moment (TM). Tail moment considers both the tail length and the fraction of DNA in the comet tailed as DNA product in the tail, and is calculated according to the following formula: tail moment (TM)=(tail intensity/total comet intensity) x (tail center of gravity-head center).

Sometimes, the interpretation of results might be difficult. Does a strong effect in the comet assay always indicate a strong genotoxic hazard? For example, several investigations show that the comet assay detects oxygen-radical induced genotoxic effects at concentrations far below those, at which cytogenetic effects or mutations are observed. Examples from human studies, furthermore, show that clear DNA effects were detected without an obvious genotoxic exposure of the individuals. Confounding factors such as physical exercise, diabetes or seasonal variation due to sunlight exposure were identified which had so far not been demonstrated to show effects in cytogenetic tests. Mutagen-induced (bad?) comets and comets arising due to

physiological processes (good comets?) are of the same microscopical appearance (they appear not only the same but they are the same: - a consequence of DNA cleavage) and can not be distinguished from each other. In addition the comet assay detects primary DNA lesions (DNA damage) such as DNA strand breaks. These lesions may not be of much relevance since they may be repaired error-free or represent transient repair sites. In vitro studies showed that elevated level of DNA migration after physical exercise mean that repair activity of DNA repair enzymes were increased due to exercise-induced oxidative stress. And comet effects induced by mutagens are mainly due to transient DNA single strand breaks formed during excision repair.

The data obtained in our study showed a different cellular behaviour between those exposed to copper and others to zinc. This could be explained by assuming different mechanism of action for each metal. Copper seems to follow a dose and not a time - effect pattern, suggesting, activation of detoxification mechanisms. Contrary to zinc, there is little evidence that copper is directly involved in promoting either DNA synthesis or repair other than indirectly in DNA damage. From the other part, zinc seems to be involved in promoting either DNA synthesis or repair. Exposure to low concentration (0.2 ppm) induced repair activity, whereas exposure to high concentration (1.0 ppm) inhibited it.

Many studies have shown that there is no clear relationship between DNA migration in the comet assay and other genetic endpoints (which we would consider more biologically relevant) resulting difficult the interpretation

of results. Nevertheless, the comet assay is a valuable tool and is an increasingly used *in vitro* as well as *in vivo* study in genotoxicity testing.

Key words: comet assay, copper, zinc, genotoxicity.